

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Kait Kaarel Puss  
**Funktsionaalse *Saccharomyces cerevisiae* Cdc7/Dbf4 kompleksi  
puhastamine rekombinantse bakuloviiruse ekspressioonisüsteemist**  
Bakalaureusetöö geenitehnoloogias  
12 EAP

Juhendaja Msc Ervin Valk

TARTU 2016

## **Funktsionaalse *Saccharomyces cerevisiae* Cdc7/Dbf4 kompleksi puhastamine rekombinantse bakuloviiruse ekspressioonisüsteemist**

Rakutsükli korrektne kontroll võimaldab rakkudel edukalt jaguneda, ilma DNA kahjustusteta või patoloogiate tekkimiseta. Rakutsükli neli faasi on G1, S, G2 ja M ning kolm kontrollpunkti, mis asuvad G1, G2 ja metafaasis. Cdc7/Dbf4 kompleks on oluline G1/S üleminekul ning aktivatsioon tuleneb G1 faasis kontrollpunkti otsustusest jätkata rakutsükliga. Valgu kompleksi üleekspressioon põhjustab inimestes vähiteket. Töös puhastatakse *S.cerevisiae* Cdc7/Dbf4 valgukompleks rekombinantse bakuloviiruse abil putukarakkudest.

Märksõnad: Cdc7, Dbf4, G1/S üleminek, kasvaja, vähiteraapia. P310 proteiinid, ensüümid

## **Isolating functional *S. cerevisiae* Cdc7/Dbf4 kinase complex via recombinational baculovirus expression system**

Strict control over the cell cycle allows cells to proliferate, without DNA damage or pathology. The cell cycle has four phases, which are G1, S, G2 and M with three checkpoints, in G1, G2 and the metaphase. The Cdc7/Dbf4 complex plays an important role for the G1/S transition and its activation is dependent on G1 checkpoint decision. Overexpression of said complex is connected to different tumours in humans. This thesis is focused on purifying the active *S.cerevisiae* Cdc7/Dbf4 complex using recombinant baculoviruses from insect cells.

Keywords: Cdc7, Dbf4, G1/S transition, tumour, cancer therapy. P310 proteins, enzymes

## Sisukord

Kasutatud lühendid.....	5
Sissejuhatus .....	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1 Eukarüootne rakutsükkel .....	7
1.2 Cdc7 roll rakutsükli.....	9
1.3 Rakutsükliga seotud kinaaside spetsiifika ja regulatsioon .....	10
1.4 Cdc7/Dbf4 valgukompleksi struktuuri kirjeldus .....	11
1.5 Cdc7/Dbf4 roll kasvajates ja vähiteraapias .....	12
1.6 Valkude ekspresseerimine ja puhastamine putukarakkudest.....	13
1.7 Valkude märkimine .....	15
1.8 Afiinsus puhastamine .....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA .....	18
2.1 Töö eesmärgid .....	18
2.2 Materjal ja meetodika.....	18
2.2.1 Söötmed ja tüved.....	18
2.2.2 Cdc7 ja Dbf4 pFastBac1 konstruktide loomine .....	18
2.2.3. pFastBac1-Cdc7 ja pFastBac1-Dbf4 konstruktide transformeerimine <i>E.coli</i> DH5α tüvesse.....	20
2.2.4 Dh10Bac transformatsioon, bakmiidse DNA eraldamine ja kontroll.....	21
2.2.5 Bakmiidse DNA eraldamine .....	21
2.2.6 Sf9 rakkude transfektsioon ja viiruse amplifikatsioon.....	22
2.2.7 Valkude ekspresseerimine Hi5 rakkudes .....	22
2.2.8. Cdc7/Dbf4 kompleksi ekspressiooni kontrollimine <i>western blot</i> meetodil.....	23
2.2.9 Cdc7/Dbf4 kompleksi afiinsuspuhastamine ja puhastamise analüüs.....	23
2.2.10 In vitro kinaasikatse .....	24
3. Tulemused ja arutelu .....	25
3.1 pFastBac1 plasmidi valmistamine .....	25

3.2 Valkude Cdc7 ja Dbf4 ekspressiooni kontrollimine <i>western blot</i> analüüsil .....	26
3.3 Cdc7/Dbf4 valgukompleksi puhastamine.....	26
3.4 Puhastatud Cdc7/Dbf4 kompleksi aktiivsuse testimine kinaasireakstioonis .....	29
Kokkuvõte .....	30
Resümee .....	31
Kasutatud kirjandus.....	32

## **Kasutatud lühendid**

Cdc7 – cell division cycle 7

Dbf4 – DumbBell former 4

G1 ja G2 – Gap 1 ja Gap 2

R – restriksiooni punkt

G1-pm – G1 faasi osa enne restriksiooni punkti

G1-ps – G1 faasi osa peale restriksiooni punkti

Ori – replikatsiooni alguspunkt

ORC – replikatsiooni alguspunkti äratundev kompleks

Mcm – minichromosome maintenance complex

Pre-RC – pre-replicative complex

Cdt1 – DNA replikatsiooni faktor

APC/C – anaphase promoting complex

DDK – Dbf4 sõltuv kinaas

Cdk – Tsükliin sõltuv kinaas

P53 – vähivastane geen

LB – Luria Bretani

S.O.C – Super optimal broth

MCS – multi cloning site

EtBr – etiidiumbromiid

Sf9 – *Spodoptera frugiperda* rakuliin

Hi5 – *Trichoplusia ni* klooni rakuliin

## Sissejuhatus

Rakutsükkel on pidev protsess, mille käigus toimub rakkude kasvamine ning jagunemine. Vältimaks vigade teket DNA sünteesil, omab rakk erinevaid kaitsemehhanisme kontrollimaks genoomi terviklikust ning katkete puudumist. Rakk läbib enne igat morfoloogiliselt olulist sündmust kontrollpunktid. Rakutsükliks on kolm kontrollpunkti G1 (restriksiooni punkt, kontrollib DNA vigastusi) (Bartek ja Lukas, 2001), G2 (G2/M üleminekul kontrollib DNA kahjustusi) (Taylor ja Stark, 2001) ning metafaasi kontrollpunkt (kontrollitakse mitootilisi kääve) (Burke ja Stukenberg, 2008). Kui faaside regulatsioonis ja ajastuses tekivad vead, siis võib tulemuseks olla kasvaja teke või rakusurm.

Rakud omavad mitmeid kontrollpunkte ja mehhanisme DNA kahjustuste vältimiseks. Vigade esinemise korral on oluline need parandada. Parandamiseks aja annab füsioloogiliste protsesside pidurdamine läbi erinevate signaali radade. Sellisteks võivad olla valkude degradeerimine, inhibeerimine või fosforüleerimine (Kim *et al.*, 2003). Rakutsükli kulgemise otsustused tulevad signaaliradadelt, kui kandub edasi vale signaal või inhibitoorne signaal katkeb, tekib kasvaja. Kasvaja on sisuliselt rakk, mille jagunemine ei ole enam kindla kontrolli all.

Cdc7 (cell division cycle) ja tema aktivaator Dbf4 (DumBell Former) on olulised rakutsükli DNA sünteesi alustamiseks. Dbf4 valk on kontrollitud rakus erinevate mehhanismide kaudu, mis reguleerivad DNA sünteesi alguse ajastamist. Valgukompleks on otsene väljund kontrollpunktist tulevale signaalile (Weinreich ja Stillman, 1999).

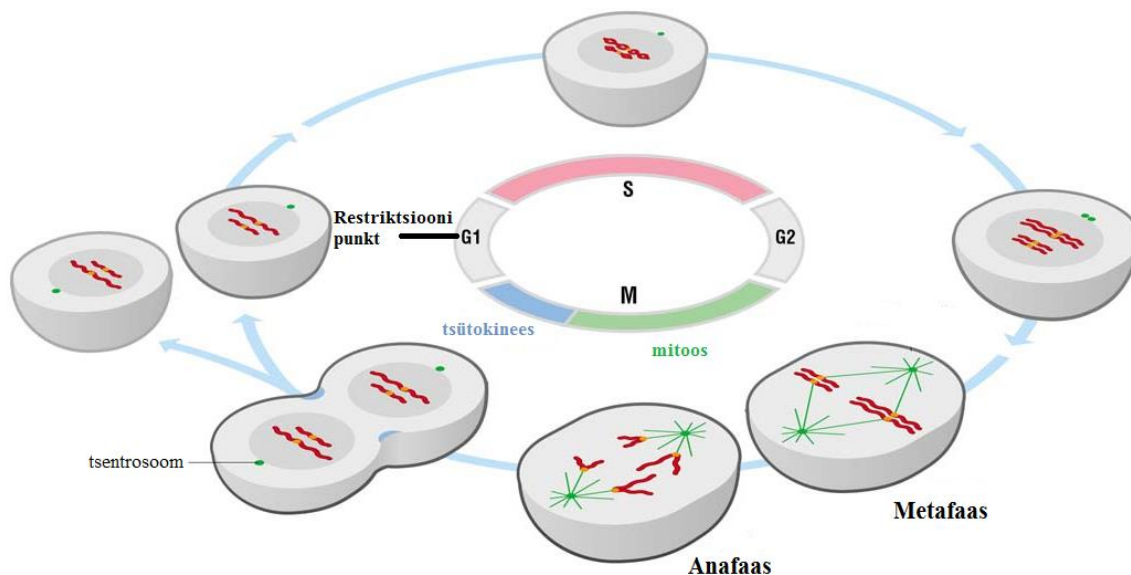
Antud bakalaureuse töö eesmärgiks on puhastada Hi5 rakkudest aktiivset *S.cerevisiae* kinaasi kompleksi Cdc7/Dbf4 ning anda ülevaade kinaasi kompleksi olulisusest nii rakutsükli kui ka vähiteraapias. Puhastatud kompleksi abil on võimalik *in vitro* katsetes uurida sihtmärk järjestusi ning tuvastada kompleksi substraate.

Töö viidi läbi Tartu Ülikooli Tehnoloogia Instituudi Proteiinkinaaside laboris. Märksõnad: Cdc7, Dbf4, G1/S üleminek, kasvaja, vähiteraapia.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Eukarüootne rakutsükkel

Rakutsükkel on keerukas protsess, mis hõlmab endas raku kasvamist ning paljunemist. Tsükkel vajab arvukaid valke ning komplekse. Keerukas süsteem võimaldab täpselt kontrollida ja reguleerida sündmuste korrektset järgnevust üksteisele, mis on vajalik edukaks rakujagunemiseks. Rakutsükkel koosneb neljast täpselt defineeritud faasist: G1, S, G2 ja M faas. Omavaheline järgnemine ja seotus on näidatud skemaatilisel joonisel 1. Morfoloogiliselt saab neid faase jaotada kaheks. Interfaasiks, mis hõlmab endas G1, S ja G2 faase, ning mitoosiks, mis jaguneb pro-, meta-, ana- ja telofaasiks (Schafer, 1998).



**Joonis 1.** Eukarüootne rakutsükkel graafiliselt, kus on välja toodud faaside omavaheline järgnevus ning restriktsooni punkt. Lisaks on veel kontrollpunkt G2 (DNA kahjustus) ning metafaasis mitootiliste käävide kontrollpunkt (Morgan, 2007).

Üleminekuid erinevate faaside vahel ja faaside pikkust mõjutavad kompleksed valgu signaali- ning regulatsioonirajad (Sherr ja Roberts, 1999). Reguleerimine seisneb normaalsete rakutsükli kinaasi komplekside inhibeerimises. Regulatsioonil on kaks tasandit: transkriptsiooniline ja transkriptsioonist sõltumatu tasand. Transkriptsioonist sõltumatu kontroll on kiirem, kuid on seotud ainult rakus juba olemasolevate valkudega ning nende omavaheliste interaktsioonidega. Inhbitsioon saavutatakse komplekside effektorite degradeerimisega või kinaaside inaktiveerimisega (Mailand, 2000). Transkriptsiooniline kontroll on aeganõudvam ja peatab rakutsükli. Uute valkude süntees võimaldab blokeerida normaalseks kulgemiseks vajaminevate valkude sünteesi (Ryan *et al.*, 2001).

Vahefaasid on vajalikud informatsiooni ülekandmiseks. Peamine signaali ülekanne on seotud DNA kahjustuste tuvastamisega (Ko ja Prives, 1996; Levine *et al.*, 1997). Kui eelnevad sündmused on edukalt lõpuni viidud ja probleeme ei tuvastata, jätkub normaalne rakutsükkel. Mõlemad vahefaasid omavad kriitilisi kontrollpunkte, millest kas liigutakse edasi järgmise faasi suunas või rakutsükkel peatatakse. Rakutsükli arestimine on vajalik DNA kahjustuste likvideerimiseks (Vermeulen *et al.*, 2003).

G1 faasi sündmused ja DNA kontroll mehhanismid on olulised rakutsükli S-faasi üleminekuks. Otsustus S-faasi minna toimub restriksiooni punktis (R) (joonis 1) (Bartek *et al.*, 1996). R jaotab G1 faasi kaheks, millest üks on peale mitoosi (G1-pm) ning teine enne S faasi (G1-ps). G1-pm kestab suhteliselt kindla ajavahemiku, seevastu G1-ps pikkus on varieeruv. Varieeruvuse põhjuseks on muutuvad tingimused keskkonnas ning genotoksiline ehk DNA kahjustusi tekitav stress (Zetterberg *et al.*, 1995).

S faas hõlmab endas DNA replikatsiooni. Eukarüootsete rakkude genoomis on mitu replikatsiooni alguspunkti (*ori*), mis jaotuvad 10 000-100 000 aluspaari (bp) pikkuste vahedega (Diffley, 2001). Replikatsiooni kompleks moodustub astmeliselt läbi erinevate valkude järjestikuse seondumise. Peamised replikatsiooni kompleksi komponendid on *ori* järjestust äratundev valk (ORC), rakutsükliga seotud valk (Cdc6) ning heteroheksameerne valkkompleks (Mcm2-7). Esmalt moodustub replikatsiooni eelne kompleks, mille aktivatsiooni eest vastutavad erinevad rakutsükliga seotud kinaasid (Labib ja Diffley, 2001). S faasis on DNA kahjustuste tuvastamiseks kontrollpunkt (Bartek *et al.*, 2004), mis omab DNA sünteesi üle kontrolli. Replikatsioonis on varased ja hilised replikatsiooni kompleksid ning nende aktivatsioon toimub S faasis erineva ajastusega. Aktiveerimata replikatsiooni kompleksidelt DNA sünteesi blokeerimine annab aega DNA reparatsiooni mehhanismidele, mis parandavad ära tekkinud katked ja vähendavad mutatsioonide tekke riski ning geneetiliste vigade kuhjumist (Shimada *et al.*, 2002).

G2 on vahefaas S ja M faaside vahel, mille käigus kontrollitakse DNA replikatsiooni tulemust ja valmistatakse rakk ette mitoosiks. Paus kahe olulise etapi vahel võimaldab parandada tekkinud vigu. M faas saab korrektselt toimuda juhul kui S faasi protsessid on lõppenud ning ei esine DNA kahjustusi (Taylor ja Stark, 2001).

Rakutsükli M faas koosneb mitoosist ja tsütokineesist. Mitoosi peamine eesmärk on jaotada duplitseerunud kromatiidid tütarrakkude vahel selliselt, et kumbki saaks ühe tervikkomplekti kromosoomi. Kromosoomide lokaliseerimiseks ja liikumiseks mitoosis on olulisel kohal käävid. Käävid on mikrotuubulitest koosnev süsteem, mis seonduvad kromosoomidele ja

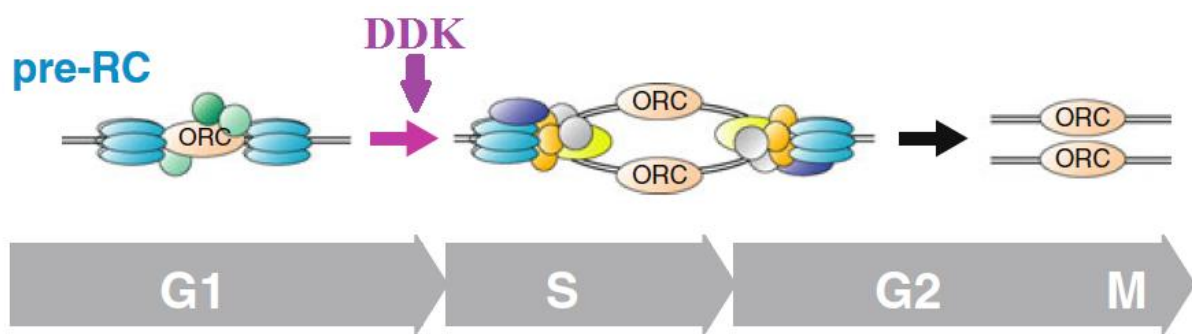


eraldavad tütarchromosoomid üksteisest vastas poolustele. Samuti peavad tütarakkude vahel ära jaotuma tsentrosoomid ning vajalik hulk organelle ja valgulisi komponente (Hartwell, 1974).

## 1.2 Cdc7 roll rakutsükli

M faasi toimumise eelduseks on S faasi protsesside korrektne lõpetamine. S faasis toimuva DNA duplikatsiooni aluseks on kogu genoomi ühekordne süntees. Cdc7/Dbf4 kompleksil on DNA sünteesi faasis kaks spetsiifilist rolli. Paremini on uuritud rolli replikatsiooni initsiatsioonis, vähem on teada kompleksi rollist DNA kahjustustes ja kontrollpunktiga seoses (Jares *et al.*, 2000).

Cdc7/Dbf4 interakteerub replikatsiooni eelse kompleksiga (pre-RC), mille osad on ORC, Cdc6 ja Mcm2-7 (joonis 2). Tinglikult saab replikatsiooni alguspunktide aktivatsiooni jaotada kaheks osaks: esimene on pre-RC moodustamine ja teine nendelt piirkondadelt ajastatud DNA replikatsiooni alustamine (Masai *et al.*, 2005).



**Joonis 2** Skemaatiliselt näidatud rakutsükli toimuvad protsessid seoses Mcm2-7 kompleksi ning tema komponentidega. DDK (Dbf4 sõltuv kinaas) fosforüleerib G1/S üleminekul Mcm2-7 heksameeri. Mitoosi lõpus moodustub pre-RC kompleks, G1 faasi lõpus toimub kompleksi aktivatsioon ning DNA dupleksi lahtiharutamine. S faasis toimub DNA süntees, mille lõpus Mcm2-7 kompleks dissotseerub. G2 seonduvad ORC-id replikatsiooni alguspunktidele ning mitoosi lõpuks moodustub taas pre-RC kompleks (Tanaka ja Araki, 2010).

Pre-RC moodustub järjestikusest seonduvatest valkudest. Esmalt seondub ori järjestusele ORC, millele lisandub Cdc6. Cdt1 (DNA replikatsiooni faktor) vahendab Mcm2-7 heksameeri liikumist tuuma (Tanaka ja Diffley, 2002), kus see lokaliseerub Cdt1 vahendusel *ori* järjestusel oleva ORC kompleksiga (Semple *et al.*, 2006). Cdc6 kasutab ATP (adenosiin trifosfaat) hüdrolüüsi energiat pre-RC kompleksi tugevaks seondamiseks DNA-ga. Tulemuseks on aktiivse pre-RC moodustumine (Randell *et al.*, 2006). Mcm2-7 kompleks on heaks substraadiks Cdc7/Dbf4-le nii *in vitro* kui ka *in vivo*. Pagaripärmi puhul on näidatud, et Cdc7 vajab oma funktsiooni täitmiseks eelnevad Cdk poolset fosforüleerimist (Nougarède *et al.*, 2000). Mcm2-7 heksameeri fosforüleerimine põhjustab konformatsiooni muutust, mille tagajärjeks on DNA

dupleksi lahtiargnemine. Hargnenud DNA dupleksi pealt saab Cdc45 abil toimuda DNA replikatsioon (Walter ja Newport, 2000).

Dbf4 seondub heksameeris kõige tugevamalt Mcm2 valguga. Cdc7 interakteerub Mcm4 ja Mcm5 valkudega. Näidatud on kinaasi kompleksi seondumise olulisust nii Cdc7 kui ka Dbf4 puhul. Mcm2 või Mcm4 docking mutandi puhul esineb DNA replikatsiooni häireid, kuid rakud on eluvõimelised. Mõlema docking mutandi esinemine rakus on fenotüübiliselt letaalse toimega. Ilmselt omavad docking interaktsioonid kattuvaid funktsioone Mcm heksameeri fosforüleerumisel (Ramer *et al.*, 2013).

Aktiivne Cdc7/Dbf4 kompleks on vajalik S-faasis ORC-idelt DNA replikatsiooni alustamiseks. Cdc7/Dbf4 toime replikatsioonile on oluline nii varaste kui ka hiliste alguspunktide puhul (Bousset ja Diffley, 1998). Cdc7 valgu tase on suhteliselt stabiilsel tasemel terve rakutsükli käigus. Kõige kõrgemat aktiivsust omab Cdc7 G1/S üleminekul (Yoon *et al.*, 1993). Cdc7 aktiveerib interaktsioon Dbf4-ga (Jackson *et al.*, 1993). APC/C (Anaphase promoting complex) degradeerib hilises mitoosis ja G1 faasi alguses Dbf4, mille kaudu kontrollitakse Cdc7 aktiivsust (Weinreich ja Stillman, 1999). Cdc7 ning Dbf4 on mõlemad kromatiiniga assotseeruvad valgud, mis mõjutavad otseselt pre-RC kompleksi. Cdc7 ning Dbf4 intreaktsiooni kestvus kromatiiniga on erinevad. Dbf4 seondub kromatiiniga G1/S üleminekul ja S-faasi vältel. Kromatiiniga seondumine ORC-ile on Cdc6 ja Mcm2-7 valkudest sõltumatu (Pasero *et al.*, 1999). Cdc7 on kromatiiniga seotud terve rakutsükli vältel (Weinreich ja Stillman, 1999).

### **1.3 Rakutsükliga seotud kinaaside spetsiifika ja regulatsioon**

Proteiinkinaasidel on oluline roll rakusiseses signaaliülekanDES ning valkude aktiivsuse reguleerimisel. Fosfaatrühma kannavad kinaasid üle kindlale aminohappele, mida ümbritseb spetsiifiline aminohappeline koosseis. Ülekantud fosfaatrühm võib mõjuda sihtmärgile aktiveerivalt või inhibeerivalt, mõju tuleneb fosfaatrühmast põhjustatud struktuurimuutmisest sihtmärkvalkudes (Bah *et al.*, 2014). Paljud rakutsükli kinaasid fosforüleerivad seriini, treoniini või türosiini. Reaktsiooni toimumiseks peab olema sihtmärkaminohape füüsiliselt eksponeeritud ja kättesaadav, lisaks on olulised ka sihtmärki ümbritsevad aminohapped, mis määravad ära kinaasidele optimaalsed ja suboptimaalsed fosforüleerimissaidid. Fosforüleerimise tugevus on optimaalsetel järjestustel tugevam ning suboptimaalsetel nõrgem (Suzuki *et al.*, 2015).

Tsükliin sõltuvad kinaasid (CDK) ja Dbf4 sõltuv kinaas (DDK) vajavad oma funktsioonide täitmiseks kofaktoreid, vastavalt tsükliine ja Dbf4. Kofaktoreid nimetatakse valgukompleksis reguloorseteks subühikuteks, mille seundumine oma sihtmärgiga omab sellele aktiveerivat toimet (Labib, 2010). Osadel kinaasidel on reguloorseid subühikuid mitu ja erineva reguloorse valgu seundumine mõjutab kinaasi spetsiifikat erinevalt (Jeffrey *et al.*, 1995). Illustreerimaks reguloorsete subühikute olulisust on heaks näiteks Cdk1, mis vahendab tähtsaid üleminekuid rakutsükli faaside vahel. Seundumine erinevate tsükliinidega on vajalik G1 alustamiseks, G1/S üleminekuks, esialgsete mitootiliste sündmuste ning mitoosi lõpetamiseks (Satyanarayana ja Kaldis, 2009). Selliseks laialdaseks tööks rakutsükliis peab muutuma kinaasi spetsiifika (Kõivomägi *et al.*, 2011).

Cdc7 on seriin-treoniin kinaas, mis on konserveerunud pärmist inimeseni ning omab sarnaselt Cdk-le reguloorset subühikut, mis mõjutab kinaasi aktiivsust ning spetsiifikat. Cdc7 aktiivsust pagaripärmis reguleerib teadaolevalt ainult Dbf4. Selgroogsetel on tuvastatud ka teine reguloorne valk, milleks on Drf1 (Takahashi ja Walter, 2005).

#### **1.4 Cdc7/Dbf4 valgukompleksi struktuuri kirjeldus**

Pagaripärmi Cdc7 on 58 308 Da suurune valk ning Dbf4 on 80 714 Da suurune valk (Yeastgenome.org). Cdc7 omab kinaasidele omapärast (Huse ja Kuriyan, 2011) kahesagaralist struktuuri, mille aktiivtsenter asub N- ja C-terminaalsete sagarate vahelises süvendis. N-sagar koosneb antiparalleelsetest  $\beta$ -lehtedest ( $\beta$ 1-  $\beta$ 5),  $\alpha$ C-heeliksist ja kahest ebaregulaarsest heeliksist (Hughes *et al.*, 2012).

C-sagar koosneb peamiselt  $\alpha$ -heeliksistest ja katalüütilisest lingust, mis sisaldab kinaasile omast RD (Arg, Asp) motiivi (Hughes *et al.*, 2012). Aktiivtsenter on struktuurilt korrapärane ning seob nukleotiidi ja  $Mg^{2+}$  iooni. Konfiguratsiooni ning nukleotiidi paiknemise poolest on Cdc7 struktuur tüüpiline teistele aktiivsetele kinaasidele ( Madhusudan *et al.*, 1994; Russo *et al.*, 1996; Canagarajah *et al.*, 1997).

Adeniini tasku moodustavad Ala88, Ile64, Met118, Met134 (gatekeeper aminohappe jääk), Tyr136, Leu184 ning Val95.  $Mg^{2+}$  iooni paiknemist koordineerivad nukleotiidi  $\alpha$ - ja  $\beta$ -fosfaatrühmad ning kinaasi Asn182 ja Asp196 (Hughes *et al.*, 2012). Fosfaatrühm on oluline komponent vesiniksidemete moodustamisel. Uued vesiniksidemed põhjustavad aktivatsiooniks vajalikku valgu konformatsiooni muutust. Põhiline on RD motiivi seundumine arginiiniga, mis põhjustab kinaasi aktiveerumist. Selline fosfaatrühma mõju on näidatud erinevatel kinaasidel (Madhusudan *et al.*, 1994; Russo *et al.*, 1996; Canagarajah *et al.*, 1997).

Dbf4 ja tema ortoloogidel on konserveerunud motiivid, mida nimetatakse N, M ja C. M ja C motiivid on vajalikud Cdc7 seondamiseks ja seeläbi Cdc7 aktiveerimiseks. M ja C motiiv seonduvad vastavalt Cdc7 C ja N sagaraga. Cdc7/Dbf4 vahele tekib seondumise tagajärjel hüdrofoobne pind. M ja C motiivid on stabiilse struktuuriga alad Dbf4 valgus. M ja C motiive ühendav ala on korrapärase struktuuriga ning on ortoloogides varieeruva pikkusega (Masai ja Arai, 2000; Kitamura *et al.*, 2011).

Dbf4 M motiiv koosneb paarist  $\beta$ -ahelast ( $\beta 1$  ja  $\beta 2$ ) ning korrapärasest spiraal struktuurist. Dbf4  $\beta 1$  ahel paardub Cdc7  $\beta 1$ -ga, moodustades antiparalleelse  $\beta$ -lehe, mis surub ennast Cdc7 C-sagara heeliksi vastu (Hughes *et al.*, 2012).

Dbf4 C motiiv koosneb kolmest  $\alpha$ -heelikst,  $\beta$ -lehe paarist ( $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ).  $\beta$ -lehed koos kahe  $\alpha$ -heeliksiga moodustavad  $Zn^{2+}$  seondumistasku,  $Zn^{2+}$  seondumist stabiliseerivad heeliksites paiknevad aminohappe jäägid (Hughes *et al.*, 2012). Need stabiliseerivad aminohappe jäägid on konserveerunud Dbf4 ortoloogidel ja on hädavajalikud Cdc7 mitootiliste ülesannete täitmiseks (Jones *et al.*, 2010; Kitamura *et al.*, 2011). Dbf4  $Zn^{2+}$  seondumistasku interakteerub Cdc7 N-sagaras olevate  $\beta$ -lehtede ning  $\alpha C$  lingudega.

Dbf4 C motiivist ning Cdc7  $\alpha C$  heeliksi interaktsioonist piisab Cdc7 aktiveerimiseks ja funktsiooni täitmiseks. Motiiv C stabiliseerib  $\alpha C$ -heeliksi abil Cdc7 aktiivsesse vormi, sarnaselt käitub  $\alpha C$ -heeliks ka CDK-des.  $\alpha C$ -heeliks on teadaolevalt oluline struktuur kinaasidel, mis töötab lülitina, mille abil toimub üleminek aktiivse ja inaktiivse struktuuri vahel (Huang *et al.*, 2012).

### 1.5 Cdc7/Dbf4 roll kasvajates ja vähiteraapias

Cdc7/Dbf4 valgu üleekspressiooni on seostatud mitmete kasvajatüüpidega, nagu osad rinna-, käärsoole- ja kopsuvähid. Cdc7 ja Dbf4 tasemed on vähirakkudes omavahel tasakaalus, kuid on ka üksikud erandid. Cdc7 ja Dbf4 üleekspressioon ei põhjusta kasvajakude kiiremat jagunemist (Bonte *et al.*, 2008). DDK üleekspressiooni puhul on p53 geen mutantne, mis on oluline vähivastane geen inimestel (Surget *et al.*, 2013).

Cdc7 inhibitsioon võib olla oluline vähiteraapia sihtmärk (Swords *et al.*, 2010a). Rinnavähi puhul on näidatud, et Cdc7 inhibitsioon võimaldab ravida p53 mutantseid kasvajaid (Rodriguez-Acebes *et al.*, 2010).

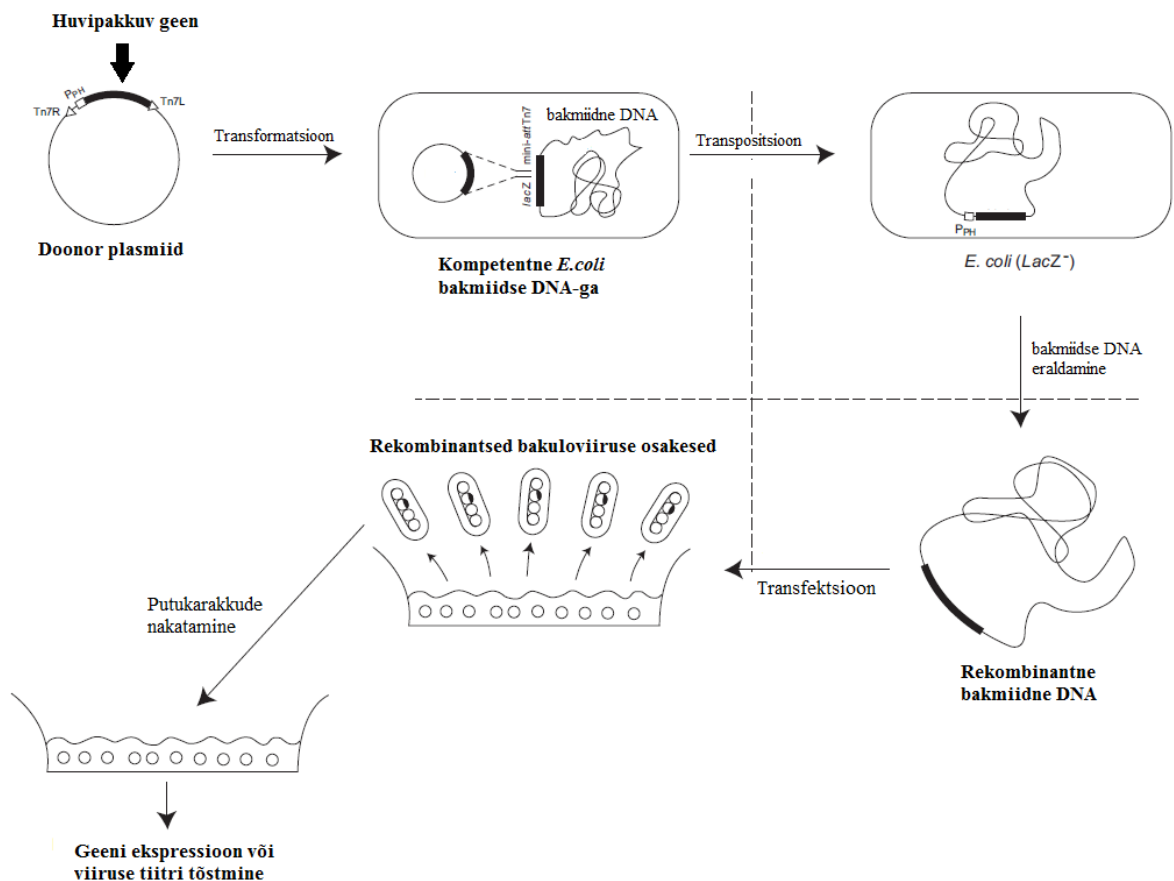
Cdc7 maha reguleerimine siRNA vahendusel vähirakkudes viib nende hävimiseni, mille põhjuseks on S faasis tekkivad probleemid. Replikatsioonikahvel ei ole piisavalt stabiliseeritud

ning toimub kromosoomide fragmenteerumine. Kuna vähirakk ei ole suuteline parandama fragmenteerunud genoomi, on tulemuseks rakusurm (Kim *et al.*, 2002; Im ja Lee, 2008). Protsessi on täheldatud nii p53 positiivsetes kui ka p53 negatiivsetes vähi rakuliinides (Montagnoli *et al.*, 2004). Sarnane inhibitsioon ei põhjusta normaalsetes fibroplastides erilist kõrget hulgal rakusurma, vaid pidurdab S faasis olevate rakkude DNA sünteesi ja tekitab DNA kahjustusi, mis hiljem parandatakse ning rakutsükkel jätkub. Cdc7 inhibitsiooni mõju on normaalsetele rakkudele arreteeriv ning pöörduv. Peale inhibitsiooni eemaldamist jätkavad normaalsed rakud oma elutegevust (Rodriguez-Acebes *et al.*, 2010). Täpselt ei ole teada, millel baseerub selline spetsiifika vähirakkudele, kuid oletatud põhjuseks võib olla vähirakkudes tagavara kontrollmehhanismide inaktiivsus. Kuna vähirakkudes on tavaliselt rakutsükli kontrollpunktid ja DNA parandamise mehhanismid mittefunktsionaalsed või vähesema funktsionaalsusega, ei ole vähirakud nii hästi kohanenud toime tulema Cdc7 inhibitsioonist tulenevate tagajärgedega (Sawa ja Masai, 2008).

Cdc7 inhibeerimine on hea sihtmärk, kuna mõjutab vaid DNA sünteesi alustamist ega sega alustatud DNA replikatsiooni. Väljatöötamisel on Cdc7 ATP konkurentne inhibiitor (PHA-767491), mis inhibeerib lisaks veel ka Cdk9, kuid mitte hädavajalikke kinaase (Montagnoli *et al.*, 2008). Cdk9 pole hädavalik raku elutegevuseks (Chiu *et al.*, 2004) ja kinaasi inhibitsioon aitab kaasa vähivastasele toimele (Natoni *et al.*, 2011). Inhibiitori ja DNA kahjustavate ühendite koos kasutamine võib pakkuda efektiivsemat ravi, kuna mõlema koostoime võib omada letaalsemat tagajärge vähirakkudele (Swords *et al.*, 2010).

### **1.6 Valkude ekspresseerimine ja puhastamine putukarakkudest**

Putukarakke kasutatakse alternatiivina seentel ja bakteritel põhinevatele ekspressioonisüsteemidele. Putukarakkudes valguekspressiooniks kasutatakse bakuloviiruseid, kus rekombinatsiooni alusel paigutatakse huvipakkuv geen tugeva polühedriini promooteri kontrolli alla. Polühedriini promooter on bakuloviiruse hiline promooter, mis on oluline polühedriini moodustumisel (Geisse *et al.*, 1996). Rekombinantse bakuloviiruse tegemiseks kasutatakse bakmiidse DNA-ga *E.coli* kompetente, kuhu rekombineerub doonor plasmiidilt ekspressioonikassett huvipakkuva geeniga. Bakmiidne DNA eraldatakse ja kasutatakse seejärel putukarakkude transfektsiooniks, joonis 3. Nakatunud putukarakkudes toimub bakuloviiruse geeniekspressioon, sellest tulenevalt sünteesitakse polühedriini promooteri kontrollitud geeni produkti, mis võimaldab putukarakkudes valku toota ning hiljem rakukultuurist puhastada.



**Joonis 3** Bac-to-Bac® Baculovirus expression system, Invitrogen. Huvipakkuv geen kloonitakse esmalt doonorplasmidi, mis seejärel transformeeritakse bakmiidse DNA-ga kompetenti, kus toimub doonorplasmidi ekspressioonikasseti järjestusspetsiifiline rekombinatsioon bakmiidse DNA-sse. Bakmiidne DNA eraldatakse ja kasutatakse putukarakkude transfektsiooniks, mille tulemusel saadakse rekombinantsete bakuloviirused. Viiruste abil viiakse läbi geeniekspressioon putukarakkudes.

Putukarakud on võimelised tegema keerulisemaid translatiooni järgseid modifikatsioone kui seentel ja bakteritel põhinevad süsteemid, sobides seega imetajate valkude puhastamiseks, kuna tagavad valkude korrektse voltumise ja sünteesijärgse modifitseerimise. Putukarakkudes toimub posttranslatiooniline modifitseerimine, mis hõlmab endas fosforüleerimist, N- ja O-glükosüleerimist, signaalpeptiidide eemaldamist, proteolüütilist töötlemist, atsüülimist, palmitüülimist ja karboksümetüülatsiooni ning palju muid (Luckow ja Summers, 1988; Miller, 1988). Samuti on bakuloviiruse abil võimalik ekspresseerida korraga mitmeid geene samas rakus, mis on eriti oluline valkkomplekside puhastamise korral (Kost *et al.*, 2005).

Kuid siiski esineb ka olulisi puudusi, sest putukarakkude valkude modifikatsiooni süsteemid on siiski piisavalt erinevad imetaja omadest ning võivad põhjustada sellega osade valkude agregeerumist, valesti voltumist või ebakorrektselt glükosüleerimise mustrit (Bisbee, 1993).

## 1.7 Valkude märkimine

Biotehnoloogias kasutatakse huvipakkuvate valkude tuvastamiseks ning eraldamiseks rakkudest aminohappelisi märke. Märki lisatakse huvipakkuva valgu N- või C-terminusse (Manstein *et al.*, 1995). Valikut võivad mõjutada eelnevad teadmised valgu struktuuri või järjestuse kohta. Märki parimaks paigutamiseks on oluline, et see ei mõjutaks valgu lahustuvust ega aktiivsust. Seega on paremad märke võimalikult lühikese aminohappelise järjestusega. Märki ja huvipakkuva valgu vahele on võimalik lisada aminohappeline linker järjestus, mis vähendab märki mõju valgu struktuurile või lahustuvusele. Samas muudab märki lisamine suhteliselt lihtsaks huvipakkuva valgu tuvastamise *western blot* analüüsil kogu raku proteoomist. Lisaks võimaldab see märgitud valkude puhastamist, milledega saab järgnevalt teostada katseid juba kontrollitumas keskkonnas kui seda on eukarüootne rakk kogu oma valgulise keskkonnaga (Young *et al.*, 2012).

Traditsiooniliselt on afiinsusmärgistest kasutatud c-myc, HA ja FLAG märke. C-myc on inimese proto-onkogeeni produkt, mis on üks esimestest märgistest, mis välja arendati. Omab väga spetsiifilist antikeha. Aminohappeline järjestus on EQKLISEEDL (Evan *et al.*, 1985). Kasutust leiab peamiselt valkude tuvastamisel, kuna selle abil valkude puhastamine on keeruline ning nõuab madalat pH-d, mis võib mõjuda negatiivselt valgu lahustuvusele, struktuurile ja selle kaudu mõjutada huvipakkuva valgu aktiivsust ja omadusi (Young *et al.*, 2012).

Kõige laialdasemat kasutust leiab HA märki, mis koosneb üheksast aminohappest (YPYDVPDYA). Järjestus pärineb inimese gripiviiruse hemaglutiniini valgust (Wilson *et al.*, 1984). Tihtipeale ei kasutata ainult ühte HA järjestust vaid mitut kordust, kuna see tagab puhastamisel või detekteerimisel suurema afiinsuse ja spetsiifilisuse ning võimaldab nii valke paremini puhastada (Ross-Macdonald *et al.*, 1997). Samas on näidatud, et HA märki võib mõjutada valkude transporti, voltumist ning seeläbi mõjuda negatiivselt valgu aktiivsusele ja funktsioneerimisele (Brothers *et al.*, 2003; Houle *et al.*, 2006).

FLAG märki epitoop on lühike hüdrofiilne kaheksast aminohappest koosnev järjestus (MDYKDDDK), mida kasutatakse antikehal põhineval afiinsuspuhastamisel (Hopp *et al.*, 1988). See märki on loodud ratsionaalse disaini printsiipidel, mis baseerub eelnevatele teadmistele aminohapete ja antikehade vahelistele interaktsioonidele. FLAG tähis omab *porcine* enterokinaasi proteaasi lõikamise järjestust, mis võimaldab eemaldada kaheksast aminohappest viis (Maroux *et al.*, 1971). FLAG märgisega valgu elueerimiseks on mitu võimalust: antikeha vahendusel kaltsium sõltuval afiinsus kromatograafial, pH-d langetades või konkurentse peptiidi abil. Puhastamiseks kasutatakse anti-FLAG M1 antikeha, mis on seotud

tahkele kandjale. Puhastamisprotsess viiakse läbi mõne tunniga, alustades raku homogenaadist või lüsaadist (Einhauer ja Jungbauer, 2001). Protsessil kasutatavad lahused matkivad füsioloogilisi tingimusi (Brizzard *et al.*, 1994). Sellist puhastamise protseduuri ei saa kasutada inkluusioon kehade puhul, kuna nende eraldamine nõuab tingimusi, mis rikuvad antikeha stabiilsust (Einhauer ja Jungbauer, 2001).

STREP märgis pärineb algselt geneetilisest raamatukogust. Välja valiti strepavidiini tuumikule kõige paremini seonduv aminohappeline järjestus (Pähler *et al.*, 1987; Schmidt ja Skerra, 1993) ja pindlikuma märgise saamiseks arendati välja optimeeritud järjestus, mis omab vähem mõju märgistatud valgule ning seondub maatriksile paremini (Voss ja Skerra, 1997; Korndörfer ja Skerra, 2002). STREP märgise aminohappeline järjestus on MAWSHPQFEK. Kasutust leiab see tähis peamiselt valgukomplekside puhastamisel füsioloogilistel tingimustel. STREP märgis ei sega valkude voltumist, sekreteerimist ega funktsionaalsust (Schmidt ja Skerra, 2007). Puhastamisel kasutatakse STREP märgisega valgu seondumist strepavidiini tuumikule. Kuna biotiin omab tugevamat afiinsust strepavidiini vastu kui STREP märgis, kasutatakse teda märgisega valgu elueerimiseks strepavidiini maatriksilt. Selline puhastamine võimaldab eraldada valke, mis on tundlikud soola konsentratsiooni või pH suhtes, samuti ei hävita puhastamise protsess valkude vahelisi interaktsioone, seega on võimalik puhastada valgukomplekse ühe märgisega (Skerra ja Schmidt, 2000). Eeliseks elueerimisel on sõltumatus metalliioonidest (Skerra ja Schmidt, 2000b).

### **1.8 Afiinsus puhastamine**

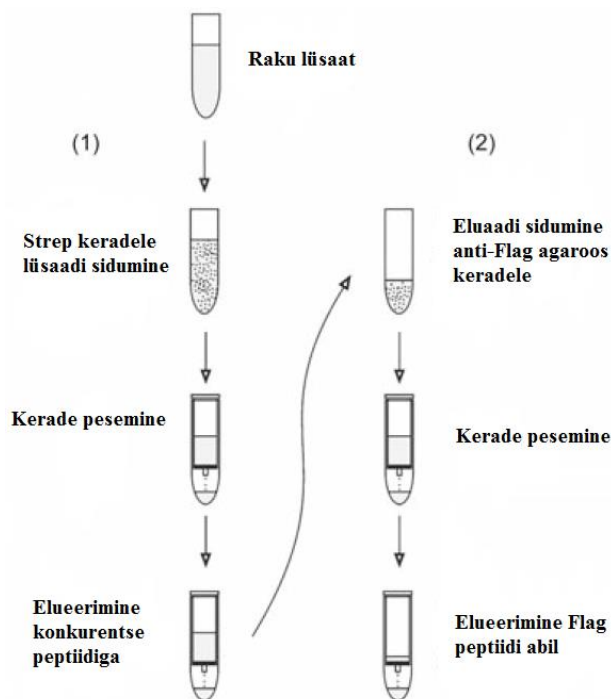
Valkude puhastamiseks on vaja need esmalt spetsiifiliselt siduda kolonnil ja seejärel tuleb huvipakkuv valk kolonnilt jälle kätte saada ehk elueerida. Samas ei tohi selle protsessi käigus muutuda valgu funktsionaalsus ja aktiivsus. Ensüümide aktiivsuse säilitamiseks on parem kui pesulahuste ning puhvrite koostis on lähedased füsioloogilistele tingimustele (Terpe, 2003).

Tüüpiline puhastamiseks kasutatav meetod on kolonn kromatograafia, mis koosneb statsionaarsest (maatriks) ja liikuvast (puhvrid ja lahused) faasist (Leonard, 1997). Kasutusel on väga erineva tööpõhimõttega maatriksid ning elueerimised. Valkude spetsiifiliseks puhastamiseks on parim viis bioloogiline afiinsus, mille põhimõte on maatriksi bioloogiline seondumine sihtmärk valguga. Märgiseid kasutatakse maatriksi ja sihtmärk valgu spetsiifiliseks seondumiseks, mis on oluline lüsaadist puhastamisel, kuna proteoomis esineb sarnaste keemiliste omadustega valke (Bolanos-Garcia ja Davies, 2006). Sihtmärk valgu seondumine maatriksile võimaldab kolonni pestes vabaneda ebasoovitavatest lisadest ning viia uuritav valk edasiseks tööks sobivasse puhvrise (Cuatrecasas ja Anfinsen, 1971). Seondumine maatriksile



ei tohi samas olla liiga tugev, kuna sellisel juhul on keeruline uuritavaid valke hiljem elueerida. Elueerimiseks on võimalik kasutada pH taseme või soola kontsentratsiooni muutust, samuti elueeritakse osadelt maatriksilt konkurentse molekuli abil (Lichty *et al.*, 2005).

Valgukomplekside puhastamiseks kasutatakse mitmeetapilist afiinsuspuhastamist, mis võib hõlmata endas erinevaid märgiseid ja nende kombinatsioone. Mitmeetapilise puhastamise tulemusel vabanetakse paremini ebaspetsiifikast, saades puhtam produkt. Mitme valgu puhastamise puhul on oluline ainult kompleksis olevate produktide saamine. Kompleksis esinevad valgud on omavahel seotud molekulaarsete interaktsioonide abil, seega kui üks valk seondub maatriksile jääb teine valk interaktsioonide abil ka seotuks. Kuna seondumist maatriksile ja elueerimist korratakse kaks korda, väheneb märgatavalt produktist kompleksis mitte olevate valkude hulk (Gloeckner *et al.*, 2009). Joonisel 3 on skemaatiliselt näidatud mitmeetapiline afiinsuspuhastamine Strep ja Flag märgisega.



**Joonis 4.** (Gloeckner *et al.*, 2009) Joonisel on näidatud lihtsustatud skeem Strep-Flag afiinsuspuhastamisest. Raku lüsaat laetakse Strep keradele, mida pestakse ning elueeritakse peptiidiga. Eluaadid laetakse anti-Flag keradele, pestakse ning elueeritakse peptiidiga 1) osa näitab Strep puhastamist ning 2) järgnevat Flag puhastamist.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

- Luua rekombinantne bakuloviirus Cdc7 ja Dbf4 geenidega
- Hi5 putukarakkudest Cdc7 ja Dbf4 kompleksi puhastamine
- Cdc7/Dbf4 kompleksi aktiivsuse testimine

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Söötmed ja tüved

LB (Luria-Bertani) vedelsööde: 10 g/l trüptooni (BD), 5 g/l pärmiekstrakti (Formedium), 10 g/l NaCl, söötme pH=7,0.

Invitrogen S.O.C (Super optimal broth): 2% trüptoon, 0.5% pärmiekstrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> ja 20 mM glükoos.

LB Dh10Bac vedelsööde: LB sööde 50 µg/ml kanamütsiin, 7 µg/ml gentamütsiin ja 10 µg/ml tetratsükliin.

LB Dh10Bac plaadid: LB sööde 15 g/l agar, 50 µg/ml kanamütsiin, 7 µg/ml gentamütsiin, 10 µg/ml tetratsükliin, 400 µg/ml X-Gal (Fermentas) ja 40 µg/ml IPTG (Fermentas) (isopropüül-β-D-1 tiogalakto-püranosiid).

ExCell 420 ja 405 Sigma-Aldrich seerumivaba terviklik sööde.

Sf9 on *Spodoptera frugiperda* rakuliin IPLB-Sf-21-AE. Hi5 on *Trichopulsia ni* rakuliin BTI-TN-5B1-4.

Invitrogeni DH10Bac genotüüp on F<sup>+</sup>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ<sup>-</sup>rpsL nupG/pMON14272/pMON7124. DH10Bac tüve kasutatakse rekombinantsete bakuloviiruste valmistamiseks (Ciccarone *et al.*, 1997).

W303 on *S.cerevisiae* tüvi MATa ura3-52 trp1Δ2 leu2-3\_112 his3-11 ade2-1 can1-100.

#### 2.2.2 Cdc7 ja Dbf4 pFastBac1 konstruktide loomine

PCR-iga amplifitseeriti Cdc7 ja Dbf4 geenid pärmi tüve W303 genoomselt DNA-lt (puhastanud M. Örd). Ühe geeni jaoks disainiti kaks pärisuunalist praimerit, üks ilma ja teine koos proteaasi lõikesaidiga, ning üks vastassuunaline praimer (tabel 1). PCR produkti restriктаasiga töötlemiseks lisati allavoolu praimer 5' otsa EcoRI ja ülesvoolu praimer 5' otsa NotI DNA lõikamisjärjestus. Allavoolu praimerile liideti restriктаasi järjestusest 3' suunas märgist

kodeeriv DNA järjestus (Cdc7 puhul FLAG märgis ja Dbf4 puhul STREP märgis). Märgise eemaldamiseks loodi allavoolu praimer, mis sisaldab geeni ja märgise vahel TEV (Tobacco Etch virus) proteaasi lõikesaiti kodeerivat DNA järjestust.

**Tabel 1.** PCR-is kasutatud praimerite järjestused. Nimede tähitstuste seletus: F – allavoolu praimer, R – ülesvoolu praimer. FLAG ning STREP – kasutatud märgis (oranž), TEV – TEV proteaasi lõikesaiti kodeeriv nukleotiidne järjestus (sinine). Restriktaaside lõikesaidid on allajoonitud.

Praimeri nimi	Praimeri nukleotiidne järjestus, 5' → 3'
Cdc7-Flag-EcoRI-F	ATATGTACAGAATTCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGCGC TATGACAAGCAAAACGAAGAATATCGATGATATACC
Cdc7-Flag -TEV-EcoRI-F	ATATGTACAGAATTCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGCGC TGAGAACCTGTACTTCCAGTCCATGACAAGCAAAACGAAGAAT ATCGATGATATACC
Cdc7-NotI-R	ATGTACATAGCGGCCGCGGCTATTCAGATATTAGGAGAACATCCTTAT CGAGCA
Dbf4-Strep-EcoRI-F	ATATGTACAGAATTCATGGCCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGC TGGCATGGTTTCTCCAACGAAAATGATAATAAGGTCTC
Dbf4-Strep-TEV-EcoRI-F	ATATGTACAGAATTCATGGCCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGC TGGCGAGAACCTGTACTTCCAGTCCATGGTTTCTCCAACGAAAATGAT AATAAGGTCTC
Dbf4-NotI-R	ATGTACATAGCGGCCGCGCCTATATTGAAATCTGAGATTTTCAATTA ACGAGTCAATAGC

PCR reaktsioonid (50 µl): 1 µl W303 tüvest puhastatud genoomset DNA-d, Thermo Scientific 1x HF puhvrit, 0,5 µM praimerite segu, 250 µM dNTP (desoksüribonukleotiidid), 1 U Thermo scientific Phusion polümeraasi ning mQ vett kuni 50 µl. PCR reaktsioonid teostati Aeris Esco Thermal Cycler termotsükleriga ja kasutatud programmid on toodud tabelis 2.

**Tabel 2.** Valkude Cdc7 ja Dbf4 kodeerivate järjestuste paljundamiseks kasutatud termotsükleri programmid.

Etapp	Cdc7	Dbf4
1.	98 °C - 5 min	98 °C - 5 min
2.	98 °C - 20 s	98 °C - 20 s
3.	58 °C - 20 s	58 °C - 20 s
4.	72 °C - 1 min 36 s	72 °C - 2 min 12 s
5.	72 °C - 5 min	72 °C 5 min
	Etappe 2-4 tehti 35 korda	Etappe 2-4 tehti 35 korda

PCR-i produktid lahutati 1% agarosgeelis (0,3 µg/ml etiidiumbromiidi) elektroforeesil 1x TAE puhvris (40 mM Tris, 1 mM EDTA-Na<sub>2</sub>-sool ja 20 mM äädikhape) elektroforeesiga. PCR-i produktide geelist puhastamiseks kasutati Favorprep™ Gel/PCR purification mini kit'ti (Favorgen Biotech Corp.) jälgides tootja juhiseid.

Cdc7 ja Dbf4 kloorimiseks pFastBac1 vektorisse lõigati PCR-i produkte ja vektorit Thermo Scientific *FastDigest* ensüümidega: EcoRI ja NotI. Restriktsioonisegu PCR korral (30 µl): 3 µl 10x *FastDigest* puhvrit, 25 µl geelist puhastatud produkti, 1 µl kumbagi ensüümi.

Restriktsioonisegu vektori korral (10 µl): 1 µl 10x *FastDigest* puhvrit, 1 µg vektorit, 1 µl kumbagi ensüümi, 1 µl *FastAP Thermosensitive Alkaline* fosfataasi (Thermo Scientific) ja 4 µl mQ vett.

Restriktsioonireaktsioonid viidi läbi 37 °C juures ning peale 60 minutit lisati neile *Orange Loading Dye* kuni 1x lõppkontsentratsioonini. Restriktsioonifragmendid lahutati 1% agarosgeelis (0,3 µg/ml etiidiumbromiidi) geelelektroforeesil 1x TAE puhvris ja puhastati geelist Favorprep™ *Gel/PCR purification Mini kit*'iga järgides tootjapoolset protokollit.

Cdc7 ja Dbf4 ligeerimiseks pFastBac1 vektorisse valmistati ligeerimisegu (20 µl): 1 µl eelnevalt lõigatud vektorit ja 8 µl restiktaasidega töödeldud PCR-i produkti, 2 µl 10x T4 ligaasi puhvrit (Thermo Scientific), 1 µl T4 DNA ligaasi (Thermo Scientific) ja 8 µl mQ vett. Ligatsioonireaktsioonid toimus üleöö (12 tundi) 18 °C juures.

### **2.2.3. pFastBac1-Cdc7 ja pFastBac1-Dbf4 konstruktide transformeerimine *E.coli* DH5α tüvesse**

Ligatsiooni segud (pFastBac1-Cdc7-FLAG ja pFastBac1-Dbf4-STREP konstruktid) transformeeriti *E.coli* DH5α tüvesse. Kompetentsed bakterid olid ettevalmistatud laborandi poolt ning säilitati -80 °C juures. Kompetendid sulatati jääl. Ligatsiooni segudele lisati 20 µl 5x KCM (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl<sub>2</sub>, 0,25 MgCl<sub>2</sub>) lahust ning 60 µl mQ vett, saadud segu (lõppmaht 100 µl) asetati jääle ning lisati 100 µl kompetente. Segu inkubeeriti 20 minutit jääl, seejärel 90 sekundit temperatuuril 42 °C ja jälle 2 minutit jääl. Transformatsioonisegudele lisati 500 µl LB söödet ning tuube inkubeeriti 37 °C juures loksutades. Peale 60 minutit tsentrifuugiti rakususpensiooni 2 minutit 6000 pööret minutis. Järgnevalt eemaldati 400 µl söödet ja rakusade suspendeeriti allesjäänud 100 µl söötmes ning plaaditi LB tassidele, mis sisaldasid 100 µg/ml ampitsilliini. Plaatide hoiti 37 °C juures kolooniate tekkimiseni.

Plasmiidse DNA eraldamiseks pandi plaatidelt koloonia 5 ml LB söötmesse (10 µg/ml ampitsilliini) ja kasvatati loksutil 37 °C juures 12 tundi. Plasmiidne DNA eraldati Favorprep™ *Plasmid DNA extraction Mini kit*'ga (Favorgen Biotech Corp.), järgides tootjapoolset juhendit. Dbf4 ja Cdc7 olemasolu plasmiidides kontrolliti restriktsioonanalüüsi ja sekveneerimisega (EBK DNA sekveneerimise tuumiklaboris).

## 2.2.4 Dh10Bac transformatsioon, bakmiidse DNA eraldamine ja kontroll

pFastBac1 konstrukte (FLAG-Cdc7, STREP-Dbf4, FLAG-TEV-Cdc7 ja STREP-TEV-Dbf4) kasutati Dh10Bac tüvesse transformatsioonil. Dh10Bac kompetendid sulatati jääl, segati kokku 30 µl kompetente ja 10 ng pFastBac1 konstrukti DNA-d ning segu inkubeeriti 30 minutit jääl, millele järgnes 45 sekundiline inkubatsioon 42 °C juures, peale mida transformatsioonisegu asetati 2 minutiks jääle. Järgnevalt lisati segudele 500 µl toasooja S.O.C söödet ning loksutati 4 tundi 37 °C juures. Kõigist segudest tehti LB söötmesse 1:10, 1:100 ja 1:1000 lahjendused, millest plaaditi Dh10Bac LB tassidele 100 µl. Saadud plaate inkubeeriti 48 tundi temperatuuril 37 °C. Tassidelt valiti välja valged ja suured kolooniad. Kooloniate suurus näitab head kasvu ja sinaka värvuse puudumine transponeerumise edukust bakmiidsesse DNA-sse.

## 2.2.5 Bakmiidse DNA eraldamine

Bakmiidse DNA eraldamiseks inokuleeriti sobivad kolooniad (kaks kolooniat iga konstrukti kohta) 2 ml Dh10Bac LB vedelsöötmesse ja kasvatati loksutil temperatuuril 37 °C 48 tundi, peale mida kultuure tsentrifuugiti 14 000 g juures 1 minut. Vedelfaas eraldati ning DNA eraldamiseks rakumassist kasutati Macherey-Nagel Nucleoband Xtra Midi kiti lahuseid. Rakumass suspendeeriti 300 µl RES puhvris, lisati 150 µl Lys puhvrit, tuube pöörati 5 korda üle otsa ning inkubeeriti laual 5 minutit. Seejärel lisati 150 µl Neu puhvrit ja tuube pöörati 5 korda üle otsa. Edasine eraldamine tehti tootja juhendi kohaselt (Invitrogen Bac-to-Bac Baculovirus expression system). Bakmiidset DNA-d kontrolliti PCR-i abil. Tabelites 5 ja 6 on kasutatud reaktsioonisegud ja PCR programm

**Tabel 3.** Bakmiidse DNA kontrollimiseks kasutatud PCR reaktsioonisegud.

Taq kontroll PCR (50 µl)	0,1 µl bakmiidne DNA, 1xYPB, 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 µM kloneerimis praimerite segu, 250 µM dNTPs, 1 U Taq polümeraasi, ddH <sub>2</sub> O lõppmahuni
Phusion kontroll PCR (50 µl)	0,1 µl bakmiidne DNA, Thermo Scientific 1xHF puhver, 0,5 µM kloneerimis praimerite segu, 250 µM dNTPs, 1 U Thermo Scientific phusion polümeraas, ddH <sub>2</sub> O lõppmahuni

**Tabel 4.** Bakmiidse DNA kontrollimiseks kasutatud PCR programmid. Etappe 2-4 korrati 30 korda. 1-2 DNA denaturatsioon, 3 praimerite seondumine, 4-5 DNA süntees.

	Cdc7 konstruktid Phusion	Dbf4 konstruktid Phusion	Cdc7 konstruktid Taq	Dbf4 konstruktid Taq
1	98 °C 5 min	98 °C 5 min	96 °C 5 min	96 °C 5 min
2	98 °C 20 s	98 °C 20 s	96 °C 30 s	96 °C 30 s
3	59 °C 20 s	59 °C 20 s	56 °C 30 s	56 °C 30 s
4	72 °C 1 min 36 s	72 °C 2 min 12 s	72 °C 1 min 36 s	72 °C 2 min 12 s
5	72 °C 5 min	72 °C 5 min	72 °C 5 min	72 °C 5 min

### **2.2.6 Sf9 rakkude transfektsioon ja viiruse amplifikatsioon**

Transfektsiooniks kasutati kuue kannuga rakukultuuriplaate, mille igasse kannu lisati  $2 \times 10^6$  Sf9 rakku 2 ml ExCell 420 söötmes. Sf9 rakkudel lasti kinnituda 30 minutit. Rakkude transfektsiooniks segati kokku kaks lahust: 1) 5 µl bakmiidse konstrukti DNA-d ja 25 µl mQ vett 2) 2 µl Icosageni 007 reagenti ja 18 µl mQ vett. Transfektsiooniks segati 1 ja 2 lahus kokku ning DNA/reagendi kompleksil lasti moodustuda 10 minutit. Lahus tilgutati kinnitunud Sf9 rakkudele, üks kann jäeti kontrolliks (ilma transfekeerimata). Kontroll võimaldab hiljem võrrelda nakatunud ja terveid rakke. Rakke inkubeeriti 3 ööpäeva (72 h) 27 °C juures. Kannust eraldati viirusparikleid sisaldav sööde 15 ml tuubi, mida tsentrifuugiti 5 minutit 1500 pööret minutis. Sedasi saadud vedelfaas tõsteti uude tuubi ning säilitati pimedas 4 °C juures. Eraldatud viiruse suspensiooni nimetatakse P1 viirusevaruks. 200 µl P1 viirusevaruga nakatati konfluentseid Sf9 rakke 10 cm rakukultuuritassil. P2 viirusevaru saamiseks talitati nagu kirjeldati P1 korral.

### **2.2.7 Valkude ekspresseerimine Hi5 rakkudes**

200 µl P2 viirusevaruga nakatati konfluentseid Sf9 rakke 15 cm rakukultuuritassil, peale mida inkubeeriti rakke 72 tundi. Järgnevalt eraldati söötimest P3 viirusvaru nagu kirjeldatud punktis 2.2.6 P1 ja P2 varu korral. Cdc7 ja Dbf4 sisaldavad P3 viirused segati kokkusuhtega 1:1 (eelnev kokkusegamine väldib hiljem viiruste suhte paigast minemist). Valguekspressioon teostati Hi5 rakkude suspensioonikultuuris 150 ml ExCell 405 söötmes. Hi5 rakkude lõpp-kontsentratsiooniks oli  $10^6$  rakku/ml, 1 ml P3 viiruse stockki  $2 \times 10^6$  raku kohta (arvestus toimub mõlema viiruse jaoks eraldi) ja ExCell 405 sööde lõppmahuni. Nakatatud Hi5 rakke kasvatatati loksutil 48 h temperatuuril 27° C 130 pööret minutis. Ekspressiooni lõpus tsentrifuugiti Hi5 rakud Sorvall RC-5B tsentrifuugis rootoriga Herolab A6.9 10 minutit 3000 pööret minutis temperatuuril 4 °C. Sööde aspireeriti ja rakusadet pesti loksutades seda 20 ml jääkülmas 1x PBS-is (0,8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,43 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Tsentrifuugi tuubi põhjast lahti tulnud sade kanti puhtasse 50 ml tuubi. Tsentrifuugi tuubi pesti veel 20 ml jääkülma 1x PBS-iga ning lisati eelnevalt juba 50 ml tuubis olevale suspensioonile. Järgnevalt tsentrifuugiti tuube Sigma 4K15C tsentrifuugis rootoriga 12169H 7 minutit 1500 pööret minutis 4 °C juures. 1x PBS aspireeriti 50 ml tuubist ja sademele lisati 1 ml lüüsipuhvrit [25 mM Hepes (pH 7,6), 15 mM KCl, 10% glütserool, 0,5% NP-40, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µg/ml aprotiniin, 1 µg/ml pepsantiin-A ja 1mM PMSF (fenüülmetüülsulfonüülfluoriid)] 20 miljoni

raku kohta. Rakumass suspendeeriti lüüsipuhvris ning külmutati vedelas lämmastikus ja säilitati -80° C

### **2.2.8. Cdc7/Dbf4 kompleksi ekspressiooni kontrollimine *western blot* meetodil**

Hi5 rakkude ekspressioonist võetud proove analüüsiti *western blotiga*. Selleks kasutati ligikaudu  $2,6 \times 10^4$  rakku 1 x Laemmli SDS puhvris (10 µl), mida kuumutati 10 minutit 100 °C. Proovides leiduvad valgud lahutati 10% SDS-polüakrülamidegeelis (SDS-PAA), 1x voolutus puhver (25 mM Tris, 192 mM glütsiin ja 0,1% SDS) voolutugevusega 15 mA geeli kohta. Elektroforeesi järgselt inkubeeriti geeli 15 minutit *Semi-Dry* ülekandepuhvris (5,8 g/l Tris, 2,9 g/l glütsiin, 0,37 g/l SDS ja 20% metanool). Ülekanne nitrotselluloos membraanile (Amersham) tehti Pierce G2 Fast blotteriga (Thermo Scientific), kasutades *Standard Semi Dry* ülekandeprogrammi. Peale ülekannet inkubeeriti membraani blokeerimis lahuses [5% lõssi ja 1 x TBS-T puhvris (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20)] 4 °C juures üleöö. Sõltuvalt valgu märgisest inkubeeriti membraani esmalt kas FLAG märgise vastase või STREP märgise vastase antikehaga. FLAG antikeha (Sigma-Aldrich) lahjendus (1:5000) ja STREP antikeha (Abcam) lahjendus (1:1000) valmistati 3% lõssi ja 1x TBS-T lahusesse. Primaarse antikehaga inkubeeriti membraane 60 minutit toatemperatuuril, mille järel pesti membraane esmalt 15 minutit ja veel 3 x 5 minutit 1x TBS-T-s. Peale pesusid inkubeeriti membraane sekundaarse antikeha [kitse jänese IgG vastane HRP kojugaat (As LabAs)] 1:7500 lahjendusega 30 minutit toatemperatuuril, peale mida pesti membraane esmalt 15 minutit ja veel 3 x 5 minutit 1x TBS-T-s. Signaalide visualiseerimiseks kasutati Supersignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate reagenti (Thermo Scientific) ja röntgenfilmi (AGFA).

### **2.2.9 Cdc7/Dbf4 kompleksi afiinsuspahastamine ja puhastamise analüüs**

-80 °C juurest võetud proov sulatati kiirelt vesivannil ja sulanud rakud asetati kohe jääle. Kogu järgnev puhastamine toimub 4° C juures. Esmalt purustati rakud Dounce homogenisaatoriga (liigutades kolbi 18 korda üles ja alla) ja saadud lüsaat valati puhtasse 15 ml tuubi, kuhu lisati KCl kuni kontsentratsioonini 250 mM ning inkubeeriti jääl 15 minutit. Lüsaate tsentrifuugiti 15 min 14 000 pööret minutis 4 °C juures. 0,5 ml Strep-Tactin XT maatriksiga (IBA) kolonni ettevalmistamisel pesti kandjat 1 ml 1x PBS-iga, seejärel pesti 2 x 2 ml 250 mM KCl lüüsipuhvriga. Tsentrifugimisel saadud supernatant laeti kolonnile 3 korda, kolonni pesti 3 x 4 ml pesupuhvriga (10 mM beta-merkaptotetanool, 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM Mg-atsetaat, 1mM imidasool, 2 mM EGTA ja 0,1% NP-40). Seondunud valgud elueeriti 5 x 0,5 ml elueerimispuhvriga [pesupuhver, millele oli lisatud 2,5 mM destiobiotiini (Sigma-Aldrich)] ja saadud eluaadid segati kokku.

100 µl ANTI-FLAG® M2 maatriksit (Sigma-Aldrich) sisaldavat kolonni pesti 2 x 0,5 ml 1x PBS-iga ja ühe korra 2 ml pesupuhvriga. STREP puhastamisel saadud eluaat laeti kolonnile 2 korda, seejärel pesti kolonni 3 x 1 ml pesupuhvriga. Seondunud kompleksid elueeriti 5 x 100 µl elueerimispuhvriga [pesupuhver millele oli lisatud 200 µg/ml Flag peptiidi (Sigma-Aldrich)]. Kõik eluaadid jaotati 10 µl kaupa tuubidesse ning külmutati vedelas lämmastikus ja säilitatati temperatuuril -80 °C.

Puhastamise käigus võeti igast puhastamise etapist proovid, milledele lisati Laemmli puhvrit 1x lõppkontsentratsioonini ja proove kuumutati 10 minutit temperatuuril 100 °C. Hindamaks puhastuse õnnestumist ja Cdc7/Dbf4 kompleksi saagist lahutati antud proovid 10% SDS-PAA geelelektroforeesil 1x voolutus puhvris. Geelis olevad valgud fikseeriti esmalt 30% etanooli ja 20% äädikhappe lahuses 25 minutit ning valgud visualiseeriti *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 värvides.

#### **2.2.10 In vitro kinaasikatse**

Kinaasi katsetes kasutatava kompleksi kontsentratsioon määrati 10% SDS-PAGE CBB G-250 värvitud geelil signaali intensiivsuse põhjal, võrreldes kompleksi ja teadaoleva kontsentratsiooniga BSA (veise seerumi albumiin) Thermo Scientific valgu lahjendusrida.

Kinaasikatse viidi läbi 20 µl, reaktsioonisegu sisaldas 50 mM Hepes (pH 7,4), 150 mM NaCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM ATP, 0,2 µg/µl BSA, 0,2 µCi/µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 3 µl substraati (-substraadi puhul 50 mM Hepes), 5 µl kinaasi kompleksi (-kinaasi puhul elueerimispuhver) ja ddH<sub>2</sub>O lõppmahuni. Katses kasutati substraatideks H1 (histoon 1) ja inimese MCM2-7 (puhastanud S. Koit), kinaasiks oli Cdc7/Dbf4 TEV konstrukt ja TEV proteaasiga töödeldud Cdc7/Dbf4 Tev konstrukt.

Reaktsioonist võeti 15 minuti ja 30 minuti pärast ajapunkt, 8 µl proovi, millele lisati 6 µl 3 x Laemmli SDS puhvrit. Proove kuumutati 3 minutit 100° C, lahutati 10% SDS-PAA ning geeli värviti CBB G-250.

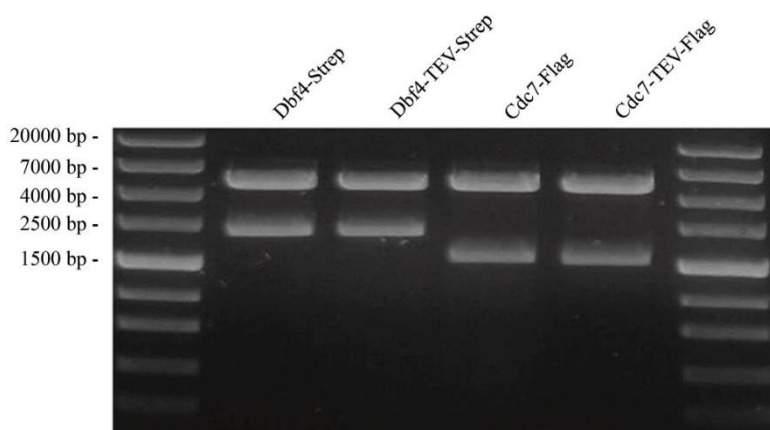


### 3. Tulemused ja arutelu

Antud bakalaureuse töö eesmärgiks oli valmistada kaks bakuloviirust, mis võimaldaksid putukarkkudes ekspresseerida pagaripärmist pärit valke: Cdc7 ja Dbf4. Bakuloviiruse ekspressiooni üheks eeliseks on võimalus putukarakkudes ekspresseerida funktsionaalseid valkude komplekse, kui rakke nakatada näiteks kahte erinevat valku ekspresseerivate viiruspartiklitega. Eesmärgiks oli valmistada neli viirust, kus valk Cdc7 oleks märgistatud C-terminaalselt FLAG märgisega ja valk Dbf4 omaks C-terminuses STREP märgist ning lisaks veel sellised kombinatsioonid, kus märgised oleksid TEV proteaasiga valkude küljest eemaldatavad. On teada, et valkudele lisatud märgised võivad mõjutada nende käitumist ja funktsionaalsust. Sellest tulenevalt otsustati lisada võimalus, mille korral saab märgised valkudelt eemaldada peale valkkompleksi puhastamist.

#### 3.1 pFastBac1 plasmidi valmistamine

pFastBac1 konstrukte kontrolliti NotI ja EcoRI restriksiooni ensüümidega (joonis 1).



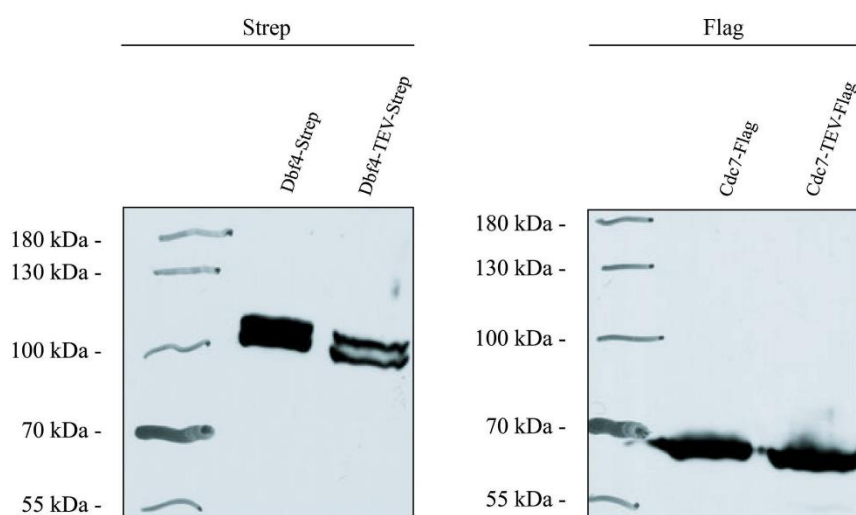
**Joonis 1.** pFastBac1 konstruktide restriksioonanalüüs. Konstrukte kontrolliti NotI ja EcoRI restriksioonidega lõigates. DNA suurusmarkeri alusel on saadud produktid vastava suurusega. Dbf4 geen on 2000 bp pikk ning Cdc7 umbes 1500 bp.

Korrektse plasmidi restriksioonanalüüsil peab Cdc7 konstrukti olema nähtav umbes 1500 bp DNA fragment ning Dbf4 konstrukti puhul umbes 2000 bp DNA fragment. Restriksioonil saadud DNA lõikude pikkust (suurust) hinnati kõrvaljooksva DNA suurusmarkeri alusel. Nagu jooniselt näha, on valgu kodeerivad järjestused pFastBac1 vektorites olemas. Lisaks restriksioon analüüsile kontrolliti eelpool mainitud konstrukte ka sekveneerimisel, veendumaks, et kloneeritud järjestuses ei esine mutatsioone ja raaminihkeid, mis võiksid põhjustada aminohappelisi asendusi valgujärjestuses.

Bakmiidse DNA kontrollimiseks tehti PCR metoodika osas kirjeldatud reaktsioonidega ning saadi iga bakmiidse konstrukti kohta korrektse suurusega PCR produkt. Bakmiidset DNA-d eraldati ainult ühest kolooniast iga konstrukti kohta ning kõik eraldatud bakmiidsed DNA-d andsid PCR kontrollis vastava pikkusega DNA fragmendi. Mitme antibiootikumiga ja sini-valge testil põhinev koloonia seleksioon võimaldab kõrge spetsiifikaga eristada rekombinantseid kolooniaid.

### 3.2 Valkude Cdc7 ja Dbf4 ekspressiooni kontrollimine *western blot* analüüsil

Enne valgu komplekside puhastamist kontrolliti individuaalsete valkude ekspressiooni taset Hi5 rakkudes *western blot*'iga (joonis 2).



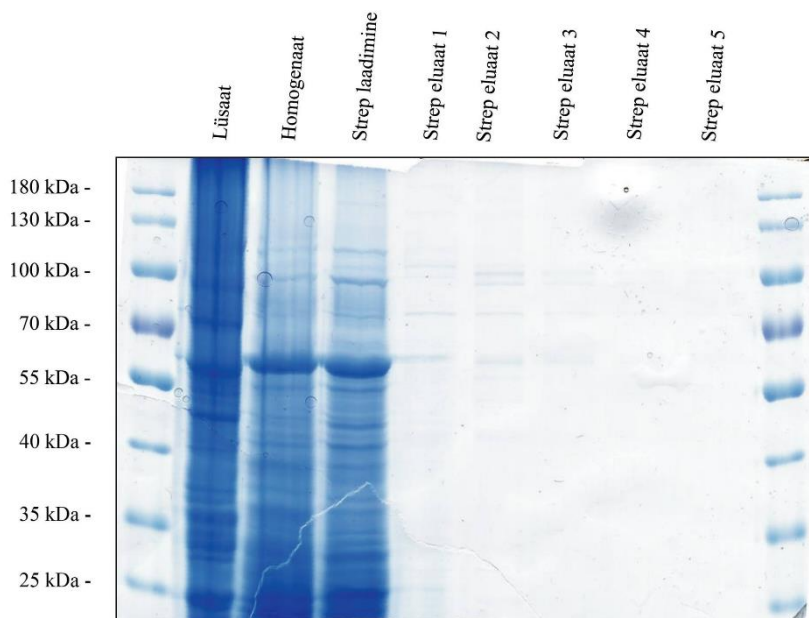
**Joonis 2.** Koekultuuri rakkudest võetud proovide *Western blot* analüüs. Näidatud ekspressioonid kõigi nelja viiruse puhul. Strep-Tag II märgise vastase antikehaga määrati Dbf4 konstruktide ja FLAG märgise vastase antikehaga Cdc7 konstruktide ekspressioon.

Lisaks ekspressiooni olemas olule hinnati ka valkude suurust. Vastavalt siis umbes 80 kDa juures Dbf4 ja 58 kDa juures Cdc7. Joonisel on näha, et Dbf4 valk jookseb PAA geelis topelt vöödina. Selle taga võib peituda kahe vöödi erinev fosforüleerimise muster. Teada on, et kinaasid fosforüleerivad endaga seotud reguleerijaid subühikuid. Näiteks võib tuua tsükliin-sõltuvad kiinaasid, mis fosforüleerivad oma reguleerijaid subühikuid, tsükliine.

### 3.3 Cdc7/Dbf4 valgukompleksi puhastamine

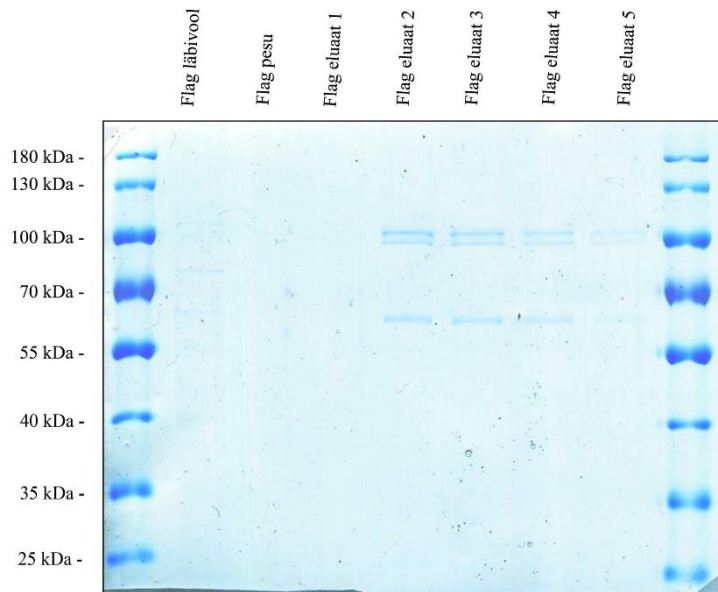
Puhastamist alustati Strep kolonniga, millelt saadud eluaadid segati kokku ja kanti järgmises etapis FLAG kolonnile. Puhastamise erinevatest etappidest võeti välja proov, et hiljem jälgida ja analüüsida puhastamisprotsessi. Selleks lahutati proovid 10% PAA geelil ja valgud värviti CBB-G250. Antud puhastamisel võeti proove lüsaadist, homogenaadist, Strep-Tactin kolonnile

viimasest laadimisest, Strep kolonni elueerimistest, anti-flag kolonnile viimasest laadimisest, anti-flag kolonni pesust ja anti-flag kolonni elueerimistest. Joonistel 3 ja 4 on näidatu CBB-G250 värvitud PAA geelid. Vastavalt siis STREP ja FLAG puhastamine.



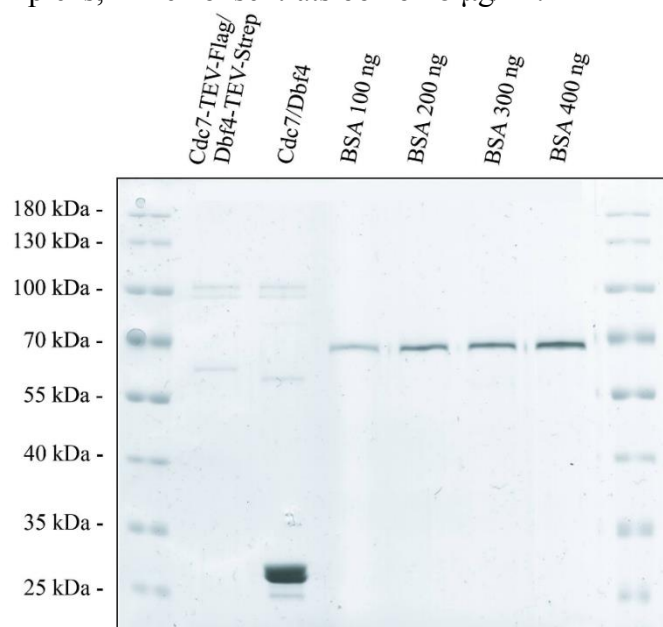
**Joonis 3.** Coomassie brilliant blue G-250 värvitud geel STREP puhastamise etappide proovidest. 10% SDS-PAA puhul kasutati 10 µl proovi 1x Laemmli SDS puhvris.

Pildilt on näha, et rakude lüüsimine ja homogeniseerimine on toimunud ning STREP eluaatides on näha kolonnile seondunud valgud. Lisaks Cdc7/Dbf4 valkudele on näha ka ebaspetsiifiliselt kolonnile seondunud valgud. Kuid tegelikult on tegemist küllalt puhta valguga juba. Piisaks ka sellest, kui üks komponent valgukompleksist märgistada ja viia läbi ühe etapiline afiinsuspuhastamine. Antud töös otsustati teha ka afiinsuspuhastamise teine etapp. Kuna see võimaldab saada puhtamat valku, aga sellest isegi olulisem on võimalus teises puhastamise etapis valku kontsentreerida. Selleks tuleb valida teisel korral väiksem kolonni ruumala, mis võimaldab väiksemas mahus elueerimist. Joonisel 4 ongi näha, kuidas antud töös õnnestus valgu kontsentratsiooni eluaatides suurendada teises puhastamise etapis. Kahe märgise kasutamise eelis on ka see, et tagab kompleksis puhastuvate valkude stöhiomeetria.



**Joonis 4.** Coomassie Brilliant blue G-250 värvitud geel Flag puhastamise etappide proovidest. Flag puhastamisel saadi kontaminantide vaba produkt, mille suurused ja välimus vastavad WB analüüsil saadud pildiga. Flag läbivoolu ja Flag pesu laeti 10 µl 1 x Laemmli SDS puhvriss, Flag eluaate 6 µl 1x Laemmli SDS puhvriss.

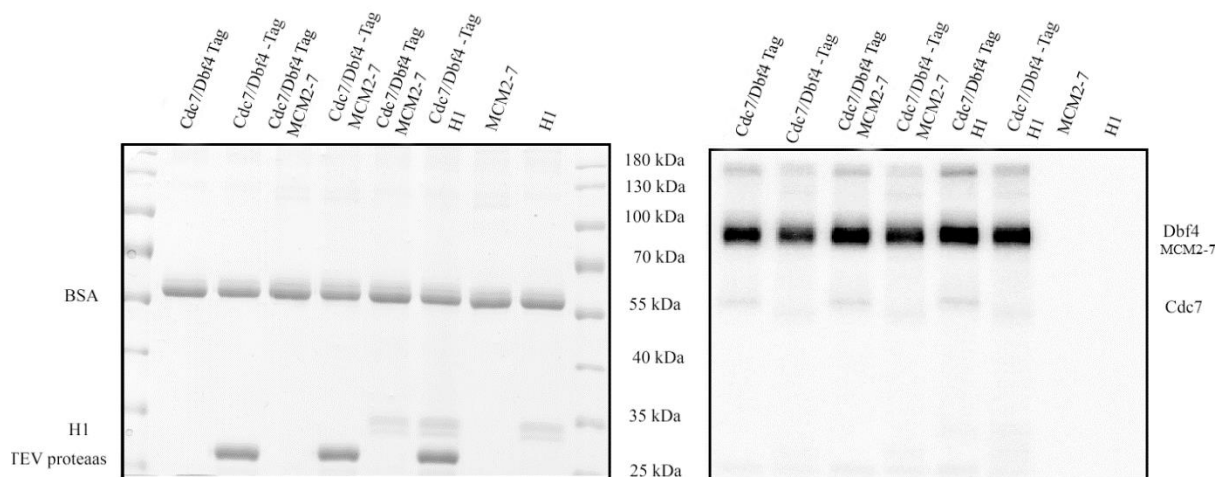
Valgukompleksi kontsentratsiooni määramisel võrreldi signaalide intensiivsust värvitud geelil teadaolevate valgukogustega BSA signaali baasil tehtud kalibreerimiskõveraga. Putukarakkudest saadi rekombinantse bakuloviiruse abil stõhhiomeetriliselt tasakaalus Cdc7/Dbf4 pärmi kompleks, mille kontsentratsioon on 8 µg/ml.



**Joonis 5.** BSA kasutamine valgukompleksi kontsentratsiooni määramiseks. Kasutati BSA kontsentratsioone 100 ng, 200 ng, 300 ng ja 400 ng. Geelil on näha Cdc7/Dbf4 kompleksi TEV töötlustest tulenevat suuruse eristumist.

### 3.4 Puhastatud Cdc7/Dbf4 kompleksi aktiivsuse testimine kinaasireaktsioonis

Puhastatud Cdc7/Dbf4 kompleksiga viidi läbi kinaasireaktsioon, et testida kompleksi aktiivsust (joonis 6).



**Joonis 6.** Vasakul Coomassie'ga värvitud geel ning paremal fosfoscreen peale kinaasi katset. H1 on bovine histoon 1 ning MCM2-7 on inimese heksameerne valk kompleks. Substraadi fosforüürimist näha ei ole, kuid Cdc7/Dbf4 autofosforüüleb.

Selleks inkubeeriti Cdc7/Dbf4 kompleksi võimalike substraatidega, nagu Histoon H1 ja inimese MCM2-7 kompleks (saadud Dr. Ivar Ilvese töögrupist). Kontrolliks tehti ka reaktsioon, kus oli ainult Cdc7/Dbf4 kompleks. Tulemustest on näha, et Dbf4 saab kinaasireaktsioonis tugevalt fosforüüritud Cdc7 poolt. Kuna MCM2-7 kompleks liigub geelis sama kiiresti kui Dbf4, siis jäi selle fosforüürimine Dbf4 fosforüürimise varju. Kirjanduses on küll kirjeldatud, et pagaripärmi Cdc7/Bbf4 kompleks fosforüürib MCM2-7 kompleksi. Samas ei ole teada, kas pärmist pärit Cdc7/Dbf4 kompleks üldse on võimeline ära tundma teistest organismidest pärit MCM2-7 komplekse. Tulemustes ei nähtud ka H1 fosforüürimist Cdc7/Dbf4 kompleksi poolt.

Käesoleva bakalaureusetöö raames puhastati putukarakkudest aktiiven pagaripärmi Cdc7/Dbf4 kompleks. Antud kompleksi on küllalt palju uuritud seoses replikatsiooni protsesside regulatsiooniga, aga siiski on vähe teada tema spetsiifiliste substraatide ja nende äratundmise mehhanismidest. Edasise eesmärgina võiks seda Cdc7/Dbf4 kompleksile spetsiifiliste substraatide leidmise. See aitaks mõista Cdc7/Dbf4 rolli replikatsiooni regulatsioonis.

## Kokkuvõte

Rakutsükli kontrollpunkti regulatsioonis osalevad valgud on määravaks rakutsükli normaalsel kulgemisel. Kontrollmehhanismide täpne regulatsioon väldib rakutsüklis tekkivate vigade kuhjumist ning rakusurma. Cdc7/Dbf4 kompleks on normaalses rakus vajalik G1/S üleminekuks, kus Cdc7 omab kõige kõrgemat aktiivsust. Cdc7 pidevat kõrget aktiivsust seostatakse vähiga ning peetakse oluliseks vähiravi sihtmärgiks, kuna omab otsest mõju Mcm2-7 kompleksile ja S faasi alustamisele. Cdc7 inhibitsiooni all kannatavad kõige rohkem vähirakud, normaalse kasvuga rakkudel on inhibitsioonist tulenev kahju pöörduv.

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärgiks oli rekombinantsete bakuloviirustega puhastada putukarakkudest funktsionaalset Cdc7/Dbf4 komplekse, seeläbi omandada teadmised ning oskused kasutatud ekspressioonisüsteemiga töötamisel. Puhastamiseks kasutati FLAG ja STREP tähistel põhinevat afiinsus kromatograafiat, mis võimaldab saada ebaspetsiifika ja kontaminatide vaba valgukompleksi. Ekspressiooniks kasutati Hi5 rakke Sf9 asemel parema saagise saamiseks. Kinaasikompleksi funktsionaalsuse kontrollimiseks kasutati H1, mis on tavapärane mudelsubstraat erinevatele kinaasidele, ja inimese Mcm2-7 heksameeri, mis on konserveerunud aminohappelise järjestusega kompleks.

Töö tulemusel loodi *S.cerevisiae* Cdc7 ja Dbf4 rekombinantseid bakuloviiruseid, näidati vastavate geenide ekspressiooni putukarakkudes ning metoodikat putukarakkudest valkude puhastamiseks. Funktsionaalsuse hindamiseks viidi läbi *in vitro* kinaasikatse nii märgistatud kui ka eemaldatud märgisega kinaasikompleksil, mis võimaldas hinnata valitud tähist mõju kinaassele aktiivsusele.

Edaspidises töös on võimalik kasutada puhastatud komplekse uute substraatide tuvastamiseks ning kinaasi spetsiifika määramiseks. Samuti saab omandatud oskuseid kasutada teiste valkude ning ensüümide puhastamiseks, kuna metoodika võimaldab korraga ekspresseerida mitut erinevat valku ilma töömahu märgatava suurenemise.

# **Isolating functional *S. cerevisiae* Cdc7/Dbf4 kinase complex via recombinational baculovirus expression system**

Kait Kaarel Puss

## **Summary**

The cell cycle is a complex system involving many signaling and functional proteins. Transitions between the cell cycle phases are controlled by signal transduction and an actuator. The active Cdc7/Dbf4 kinase complex plays a major part in the cell cycle G1/S transition by phosphorylating the Mcm2-7 helicase complex, this initiates the S phase of the cell cycle. Overexpression of these proteins in mammals are often connected to malignant tumours. Since Cdc7/Dbf4 is directly connected to the control of G1/S transition, it is a promising target for cancer therapy. It has been shown, that inhibition of Cdc7 causes cell death in cancer cells but only prolongs G1 phase in normally functioning cells. Hence possibly offering a treatment with minor repercussions.

This thesis focuses on the role of Cdc7/Dbf4 in the cell cycle and the purification of the *S.cerevisiae* Cdc7/Dbf4 complex. This is accomplished by using recombinant baculoviruses to express proteins in insect cells and tandem affinity purification using STREP and FLAG tags. TEV protease cutting sequences were inserted between the tags and proteins, to evaluate the effects that tags may have on the protein activity.

We showed that the expression and purification choices were valid in attaining this goal. Recombinant baculoviruses showed to be a promising system for expressing many proteins in the same culture. Tandem affinity purification leads to pure product, which is essential for *in vitro* experiments for determining docking interactions, activity or inhibition. Although the complex we purified did not show activity for the human MCM2-7 or bovine histone 1. The system is still good for purifying complexes. Future goals include purifying human Cdc7/Dbf4 complex to research docking interactions, substrates and inhibitors.

## **Kasutatud kirjandus**

- Bah, A., Vernon, R.M., Siddiqui, Z., Krzeminski, M., Muhandiram, R., Zhao, C., Sonenberg, N., Kay, L.E., ja Forman-Kay, J.D. (2014). Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature advance on*: 110–117.
- Bartek, J., ja Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 738–747.
- Bartek, J., Bartkova, J., ja Lukas, J. (1996). The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 805–814.
- Bartek, J., Lukas, C., ja Lukas, J. (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 792–804.
- Bisbee, C.A. (1993). Current perspectives on manufacturing and scaleup of biopharmaceuticals. *Gen Eng News* 13: 8–10.
- Bolanos-Garcia, V.M., ja Davies, O.R. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1760: 1304–1313.
- Bonte, D., Lindvall, C., Liu, H., Dykema, K., Furge, K., ja Weinreich, M. (2008). Cdc7-Dbf4 kinase overexpression in multiple cancers and tumor cell lines is correlated with p53 inactivation. *Neoplasia* 10: 920–931.
- Bousset, K., ja Diffley, J.F.X. (1998). The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase The Cdc7 protein kinase is required for origin firing during S phase. *Genes Dev.* 12: 480–490.
- Brizzard, B.L., Chubet, R.G., ja Vizard, D.L. (1994). Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques* 16: 730–732+734.
- Brothers, S.P., Janovick, J.A., ja Conn, P.M. (2003). Unexpected Effects of Epitope and Chimeric Tags on Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors: Implications for Understanding the Molecular Etiology of Hypogonadotropic Hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88: 6107–6112.
- Burke, D.J., ja Stukenberg, P.T. (2008). Linking Kinetochore-Microtubule Binding to the Spindle Checkpoint. *Dev. Cell* 14: 474–479.



- Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., ja Goldsmith, E.J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90: 859–869.
- Chiu, Y.-L., Cao, H., Jacque, J.-M., Stevenson, M., ja Rana, T.M. (2004). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference directed against human transcription elongation factor P-TEFb (CDK9/CyclinT1). *J. Virol.* 78: 2517–2529.
- Ciccarone, V.C., Polayes, D.A., ja Luckow, V.A. (1997). Generation of Recombinant Baculovirus DNA in E.coli Using a Baculovirus Shuttle Vector. *Methods Mol. Med.* 13: 213–235.
- Cuatrecasas, P., ja Anfinsen, C.B. (1971). [31] Affinity chromatography. *Methods Enzymol.* 22: 345–378.
- Diffley, J.F.X. (2001). DNA replication: Building the perfect switch. *Curr. Biol.* 11: 367–370.
- Einhauer, A., ja Jungbauer, A. (2001). The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* 49: 455–465.
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., ja Bishop, J.M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3610–3616.
- Geisse, S., Gram, H., Kleuser, B., ja Kocher, H.P. (1996). Eukaryotic expression systems: a comparison. *Protein Expr. Purif.* 8: 271–282.
- Gloeckner, C.J., Boldt, K., Schumacher, A., ja Ueffing, M. (2009). Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells by the Strep/FLAG (SF)-TAP tag. *Methods Mol. Biol.* 564: 359–372.
- Hartwell, L.H. (1974). *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. *Am. Soc. Microbiol.* 38: 164–198.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., Urdal, D.L., ja Conlon, P.J. (1988). A Short Polypeptide Marker Sequence Useful For Recombinant Protein Identification And Purification. *Biotechnology* 6: 1204–1210.
- Houle, T.D., Ram, M.L., McMurray, W.J., ja Cala, S.E. (2006). Different endoplasmic reticulum trafficking and processing pathways for calsequestrin (CSQ) and epitope-tagged CSQ. *Exp. Cell Res.* 312: 4150–4161.
- Huang, H., Zhao, R., Dickson, B.M., Skeel, R.D., ja Post, C.B. (2012).  $\alpha$ C helix as a switch in

the conformational transition of Src/CDK-like kinase domains. *J. Phys. Chem. B* 116: 4465–4475.

Hughes, S., Elustondo, F., Di Fonzo, A., Leroux, F.G., Wong, A.C., Snijders, A.P., Matthews, S.J., ja Cherepanov, P. (2012). Crystal structure of human CDC7 kinase in complex with its activator DBF4. *Nat Struct Mol Biol* 19: 1101–1107.

Huse, M., ja Kuriyan, J. (2011). The Conformational Plasticity\Review of Protein Kinases. *Cell* 109: 1–8.

Im, J.-S., ja Lee, J.-K. (2008). ATR-dependent activation of p38 MAP kinase is responsible for apoptotic cell death in cells depleted of Cdc7. *J. Biol. Chem.* 283: 25171–25177.

Jackson, A.L., Pahl, P.M.B., Harrison, K., Rosamond, J., ja Sclafani, R.A. (1993). Cell cycle regulation of the yeast Cdc7 protein kinase by association with the Dbf4 protein. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2899–2908.

Jares, P., Donaldson, a, ja Blow, J.J. (2000). The Cdc7/Dbf4 protein kinase: target of the S phase checkpoint? *EMBO Rep.* 1: 319–322.

Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., ja Pavletich, N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376: 313–320.

Jones, D.R., Prasad, A.A., Chan, P.K., ja Duncker, B.P. (2010). The Dbf4 motif C zinc finger promotes DNA replication and mediates resistance to genotoxic stress. *Cell Cycle* 9: 2018–2026.

Kim, J.M., Nakao, K., Nakamura, K., Saito, I., Katsuki, M., Arai, K., ja Masai, H. (2002). Inactivation of Cdc7 kinase in mouse ES cells results in S-phase arrest and p53-dependent cell death. *EMBO J.* 21: 2168–2179.

Kim, J.M., Yamada, M., ja Masai, H. (2003). Functions of mammalian Cdc7 kinase in initiation/monitoring of DNA replication and development. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 532: 29–40.

Kitamura, R., Fukatsu, R., Kakusho, N., Cho, Y.-S., Taniyama, C., Yamazaki, S., Toh, G., Yanagi, K., Arai, N., Chang, H.-J., *et al.* (2011). Molecular mechanism of activation of human Cdc7 kinase: bipartite interaction with Dbf4/activator of S phase kinase (ASK) activation subunit stimulates ATP binding and substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 286:

23031–23043.

Ko, L.J., ja Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10: 1054–1072.

Korndörfer, I.P., ja Skerra, A. (2002). Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein Sci.* 11: 883–893.

Kost, T.A., Condreay, J.P., ja Jarvis, D.L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 23: 567–575.

Kõivomägi, M., Valk, E., Venta, R., Iofik, A., Lepiku, M., Morgan, D.O., ja Loog, M. (2011). Dynamics of Cdk1 Substrate Specificity during the Cell Cycle. *Mol. Cell* 42: 610–623.

Labib, K. (2010). How do Cdc7 and cyclin-dependent kinases trigger the initiation of chromosome replication in eukaryotic cells? *Genes Dev.* 24: 1208–1219.

Labib, K., ja Diffley, J.F.X. (2001). Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 64–70.

Leonard, M. (1997). New packing materials for protein chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 699: 3–27.

Levine, A.J., Aas, T., Borresen, A.-L., Geisler, S., Smith-Sorensen, B., Johnsen, H., Vargaug, J., Akslen, L., Lonning, P., Bond, J., *et al.* (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 88: 323–331.

Lichty, J.J., Malecki, J.L., Agnew, H.D., Michelson-Horowitz, D.J., ja Tan, S. (2005). Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr. Purif.* 41: 98–105.

Luckow, V.A., ja Summers, M.D. (1988). Trends in the Development of Baculovirus Expression Vectors. *Bio/Technology* 6: 47–55.

Madhusudan, Trafny, E.A., Xuong, N.H., Adams, J.A., Ten Eyck, L.F., Taylor, S.S., ja Sowadski, J.M. (1994). cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer. *Protein Sci.* 3: 176–187.

Mailand, N. (2000). Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science* (80-. ). 288: 1425–1429.

Manstein, D.J., Schuster, H.P., Morandini, P., ja Hunt, D.M. (1995). Cloning vectors for the production of proteins in *Dictyostelium discoideum*. *Gene* 162: 129–134.

- Maroux, S., Baratti, J., ja Desnuelle, P. (1971). Purification and specificity of porcine enterokinase. *J. Biol. Chem.* 246: 5031–5039.
- Masai, H., ja Arai, K. (2000). Dbf4 motifs: conserved motifs in activation subunits for Cdc7 kinases essential for S-phase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 228–232.
- Masai, H., You, Z., ja Arai, K. (2005). Control of DNA replication: regulation and activation of eukaryotic replicative helicase, MCM. *IUBMB Life* 57: 323–335.
- Miller, L.K. (1988). Baculoviruses as gene expression vectors. *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 177–199.
- Montagnoli, A., Tenca, P., Sola, F., Carpani, D., Brotherton, D., Albanese, C., ja Santocanale, C. (2004). Cdc7 inhibition reveals a p53-dependent replication checkpoint that is defective in cancer cells. *Cancer Res.* 64: 7110–7116.
- Montagnoli, A., Valsasina, B., Croci, V., Menichincheri, M., Rainoldi, S., Marchesi, V., Tibolla, M., Tenca, P., Brotherton, D., Albanese, C., *et al.* (2008). A Cdc7 kinase inhibitor restricts initiation of DNA replication and has antitumor activity. *Nat. Chem. Biol.* 4: 357–365.
- Morgan, D.O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control*.
- Natoni, A., Murillo, L.S., Kliszczak, A.E., Catherwood, M.A., Montagnoli, A., Samali, A., O'Dwyer, M., ja Santocanale, C. (2011). Mechanisms of Action of a Dual Cdc7/Cdk9 Kinase Inhibitor against Quiescent and Proliferating CLL Cells. *Mol. Cancer Ther.* 10: 1624–1634.
- Pasero, P., Duncker, B.P., Schwob, E., ja Gasser, S.M. (1999). A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication. *Genes Dev.* 13: 2159–2176.
- Pähler, A., Hendrickson, W.A., Kolks, M.A., Argaraña, C.E., ja Cantor, C.R. (1987). Characterization and crystallization of core streptavidin. *J. Biol. Chem.* 262: 13933–13937.
- Ramer, M.D., Suman, E.S., Richter, H., Stanger, K., Spranger, M., Bieberstein, N., ja Duncker, B.P. (2013). Dbf4 and Cdc7 proteins promote DNA replication through interactions with distinct Mcm2-7 protein subunits. *J. Biol. Chem.* 288: 14926–14935.
- Randell, J.C.W., Bowers, J.L., Rodríguez, H.K., ja Bell, S.P. (2006). Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Mol. Cell* 21: 29–39.

Rodriguez-Acebes, S., Proctor, I., Loddo, M., Wollenschlaeger, A., Rashid, M., Falzon, M., Prevost, A.T., Sainsbury, R., Stoeber, K., ja Williams, G.H. (2010). Targeting DNA Replication before it Starts. *Am. J. Pathol.* 177: 2034–2045.

Ross-Macdonald, P., Sheehan, A., Roeder, G.S., ja Snyder, M. (1997). A multipurpose transposon system for analyzing protein production, localization, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 190–195.

Russo, A.A., Jeffrey, P.D., ja Pavletich, N.P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.* 3: 696–700.

Ryan, K., Phillips, A., ja Vousden, K. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 332–337.

Satyanarayana, A., ja Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* 28: 2925–2939.

Sawa, M., ja Masai, H. (2008). Drug design with Cdc7 kinase: A potential novel cancer therapy target. *Drug Des. Devel. Ther.* 4: 255–264.

Schafer, K.A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Vet. Pathol.* 35: 461–478.

Schmidt, T.G., ja Skerra, A. (1993). The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng.* 6: 109–122.

Schmidt, T.G.M., ja Skerra, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* 2: 1528–1535.

Semple, J.W., Da-Silva, L.F., Jervis, E.J., Ah-Kee, J., Al-Attar, H., Kummer, L., Heikkila, J.J., Pasero, P., ja Duncker, B.P. (2006). An essential role for Orc6 in DNA replication through maintenance of pre-replicative complexes. *EMBO J.* 25: 5150–5158.

Sherr, C.J., ja Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501–1512.

Shimada, K., Pasero, P., ja Gasser, S.M. (2002). ORC and the intra-S-phase checkpoint: A threshold regulates Rad53p activation in S phase. *Genes Dev.* 16: 3236–3252.

Skerra, A., ja Schmidt, T.G. (2000a). Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 326: 271–304.

- Skerra, A., ja Schmidt, T.G. (2000b). Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 326: 271–304.
- Surget, S., Khoury, M.P., ja Bourdon, J.C. (2013). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. *Onco. Targets. Ther.* 7: 57–67.
- Suzuki, K., Sako, K., Akiyama, K., Isoda, M., Senoo, C., Nakajo, N., ja Sagata, N. (2015). Identification of non-Ser/Thr-Pro consensus motifs for Cdk1 and their roles in mitotic regulation of C2H2 zinc finger proteins and Ect2. *Sci. Rep.* 5: 7929.
- Swords, R., Mahalingam, D., O'Dwyer, M., Santocanale, C., Kelly, K., Carew, J., ja Giles, F. (2010a). Cdc7 kinase - a new target for drug development. *Eur. J. Cancer* 46: 33–40.
- Swords, R., Mahalingam, D., O'Dwyer, M., Santocanale, C., Kelly, K., Carew, J., ja Giles, F. (2010b). Cdc7 kinase - A new target for drug development. *Eur. J. Cancer* 46: 33–40.
- Zetterberg, A., Larsson, O., ja Wiman, K.G. (1995). What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 835–842.
- Takahashi, T.S., ja Walter, J.C. (2005). Cdc7 – Drf1 is a developmentally regulated protein kinase required for the initiation of vertebrate DNA replication. *Genes Dev.* 2295–2300.
- Tanaka, S., ja Araki, H. (2010). Regulation of the initiation step of DNA replication by cyclin-dependent kinases. *Chromosoma* 119: 565–574.
- Tanaka, S., ja Diffley, J.F.X. (2002). Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat. Cell Biol.* 4: 198–207.
- Taylor, W.R., ja Stark, G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20: 1803–1815.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 523–533.
- Weinreich, M., ja Stillman, B. (1999). Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway. *EMBO J.* 18: 5334–5346.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., ja Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: A review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36: 131–149.
- Wilson, I.A., Niman, H.L., Houghten, R.A., Cherenson, A.R., Connolly, M.L., ja Lerner, R.A.

(1984). The structure of an antigenic determinant in a protein. *Cell* 37: 767–778.

Voss, S., ja Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10: 975–982.

Yoon, H., Loo, S., ja Campbell, J. (1993). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* CDC7 function during the cell cycle. *Mol. Biol. Cell* 4: 195–208.

Young, C.L., Britton, Z.T., ja Robinson, A.S. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol. J.* 7: 620–634.

## **Lihthitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Kait Kaarel Puss

(sünnikuupäev: 19.05.2016)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihthitsentsi) enda loodud teose Funktsionaalse *Saccharomyces cerevisiae* Cdc7/Dbf4 kompleksi puhastamine rekombinantse bakuloviiruse ekspressioonisüsteemist, mille juhendaja on Ervin Valk.
  - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **24.05.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihthitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016